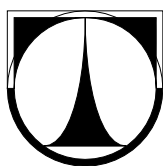


**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI**

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Liberec 2013

**Jakub Vojtěch**

---

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI**  
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

**Studijní program:** B3942 Nanotechnologie  
**Studijní obor:** 3942T002 Nanomateriály

---

**Vývoj tkáňových nosičů pro cévní implantáty**

**Tissue engineering scaffolds for vascular grafts**

**Bakalářská práce**

**Autor:** Jakub Vojtěch  
**Vedoucí práce:** Prof. RNDr. David Lukáš, CSc.  
**Konzultant:** Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.

**V Liberci 17. 5. 2013**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jakub Vojtěch**  
Osobní číslo: **M10000081**  
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**  
Studijní obor: **Nanomateriály**  
Název tématu: **Vývoj tkáňových nosičů pro cévní implantáty**  
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu o cévních tkáňových implantátech.
2. Navrhněte polymery, zvláknovací roztoky a zařízení pro laboratorní výrobu cévních implantátů.
3. Proveďte laboratorní výrobu, odeberte vzorky a testujte jejich strukturu, mechanické vlastnosti a popřípadě biologické vlastnosti.
4. Získané experimentální výsledky diskutujte.

Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Rozsah pracovní zprávy: 45 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury:

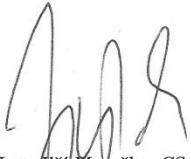
- [1] ANDRADY, A. Science and technology of polymer nanofibers. Hoboken, N.J.: Wiley, c2008, xix, 403 p. ISBN 04-717-9059-1.  
[2] LUKÁŠ, D. et al. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). Taylor & Francis, 2009, ISSN 0040-5167.

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. David Lukáš, CSc.  
Katedra netkaných textilií  
Konzultant bakalářské práce: Ing. Pavel Pokorný, Ph.D.  
Katedra netkaných textilií

Datum zadání bakalářské práce: 18. října 2012  
Termín odevzdání bakalářské práce: 17. května 2013

  
prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.  
děkan



  
prof. Dr. Ing. Jiří Marýška, CSc.  
vedoucí ústavu

V Liberci dne 18. října 2012

## **Prohlášení**

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum

Podpis

## Poděkování

Tímto bych rád poděkoval Prof. RNDr. Davidu Lukášovi, CSc. za jeho cenné rady a konzultace, dále Ing. Pavlu Pokornému, Ph.D. za poskytnutí technické podpory a jeho podnětné náměty k úvahám, které mi poskytl, a zbytku týmu, který se podílel na práci týkající se střídavého zvlákňování, Ipek Yalçın, se kterou jsem měl možnost tu spolupracovat na výrobě tkáňových nosičů a také za to, že mi velmi pomohla s vyhodnocením výsledků, Ing. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za pomoc při měření mechanických vlastností vzorků, Ing. Denise Zálešákové za rady při práci v laboratořích, Mgr. Janě Horákové za poskytnutí cenných informací, Ing. Pavlu Kejzlarovi za pořízení snímků nejlepším elektronovým mikroskopem na univerzitě a centralizovanému rozvojovému projektu č. 12091 s názvem Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL.

## **Abstrakt**

Pro potřeby dnešního tkáňového inženýrství je třeba vyrobit tkáňový nosič, který by dokázal vhodně napodobit strukturu mimobuněčné hmoty. Nanovlákná připravená metodou stejnosměrného elektrostatického zvlákňování se zdají pro tento účel velmi vhodná, jelikož průměry těchto nanovláken odpovídají průměrům vláken mimobuněčné hmoty. Jako materiál byl použit poly( $\epsilon$ -kaprolakton), syntetický biodegradabilní polymer. Byly připraveny vzorky scaffoldů na válcovém kolektoru s různými rychlostmi otáčení. Analýza elektronovým mikroskopem ukázala, že od 5000 RPM vznikala uspořádaná struktura, přičemž se zvyšujícími se otáčkami se zvyšovala i uspořádanost, která má vliv na mechanické vlastnosti vzorků. Připravené vzorky se zdají vhodné k vytvoření vnitřní vrstvy tkáňových nosičů pro cévní implantáty. Pro úspěšné napodobení střední vrstvy cévy je třeba vytvořit dostatečně pórovitou vrstvu vláken. Novou zcela unikátní metodou střídavého elektrostatického zvlákňování byly připraveny vzorky polyvinylbutyralu. Jejich struktura byla analyzována a porovnána se vzorky připravenými stejnosměrným elektrostatickým zvlákňováním. Podle výsledků lze soudit, že tato technologie by mohla být vhodná k výrobě druhé vrstvy tkáňového nosiče pro cévní tkáňové implantáty.

### **Klíčová slova:**

Tkáňové inženýrství, tkáňový nosič, nanotechnologie, nanovlákná, elektrostatické zvlákňování

## **Abstrakt**

For today tissue engineering it is necessary to produce scaffold, that would mimic the structure of native extracellular matrix. Nanofibers prepared by electrospinning seem to be very good for this purpose, because of their diameters which are similar to diameters of the extracellular matrix fibers. Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) - synthetic biodegradable polymer was used. The samples were prepared using a rotating mandrel with different rotation speeds. The electron microscopy analysis discovered, that structure of oriented fibers is obtained by rotations 5000 RPM. The more rotations is used, better orientation is obtained. The orientation of fibers play role in mechanical properties of the material. The samples seem to be suitable to form the inner layer of the scaffold. To make the second layer, more porous material is needed. A new unique method – alternating current electrospinning – was used to make samples of polyvinylbutyral. The structure of samples was analyzed and compared to the samples of polyvinylbutyral prepared by direct current electrospinning. It seems this new technology is suitable to make the second layer of the scaffold for vascular graft.

## **Key words**

Tissue engineering, scaffold, nanotechnology, nanofibers, electrospinning



## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	11
2.1. Oběhová soustava.....	11
2.1.1. Srdce.....	11
2.1.2. Krev.....	11
2.1.3. Cévy .....	12
2.2. Implantáty používané v současnosti.....	13
2.2.1. Biologické cévní náhrady.....	14
2.2.2. Cévní náhrady umělé .....	15
2.3. Mimobuněčná hmota.....	16
2.4. Tkáňové inženýrství .....	16
2.4.1. Tkáňový nosič.....	17
2.5. Nanotechnologie pro výrobu tkáňových nosičů.....	18
2.5.1. Nanotechnologie .....	18
2.5.2. Nanovlákná .....	19
2.5.3. Elektrostatické zvlákňování .....	20
2.5.4. Elektrostatické zvlákňování na válcový kolektor .....	24
2.6. Polymery využívané pro výrobu tkáňových nosičů .....	26
2.6.1. Požadované vlastnosti.....	27
2.6.2. Polymery využívané v praxi .....	27
3. Experimentální část.....	31
3.1. Výroba tkáňových nosičů pro cévní implantáty.....	31
3.1.1. Metody.....	31
3.1.2. Výsledky.....	34
3.2. Analýza vzorků střídavého elektrostatického zvlákňování .....	40
3.2.1. Střídavé zvlákňování .....	41
3.2.2. Metody.....	42
3.2.3. Výsledky.....	45
Závěr .....	53
Seznam použitých pojmů .....	54
Seznam použité literatury.....	56

## **Seznam symbolů zkratek a termínů:**

AC – Alternating current, střídavý proud

DC – Direct current, stejnosměrný proud

DCM - Dichlormethan

ECM – Extracellular matrix – mimobuněčná hmota

FB - Fibroblast

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Oxid železitý

P(LLA-CL) - Kopolymer kyseliny poly(L–mléčné) a poly(ε-kaprolaktonu)

PCL – Poly(ε-caprolaktone)

PDO - Polydioxanon

PGA – Kyselina polyglykolová

PLA – Kyselina polymléčná

PLCL – Kopolymer kyseliny polymléčné a poly(ε-kaprolaktonu)

PLGA – Kopolymer kyseliny polymléčné a polyhlykolové

PLLA - Kyselina poly- L- mléčná

PTFE – Polytetrafluorethylen

SMC – Smooth muscle cell – hladká svalová buňka

TiO<sub>2</sub> – Oxid titaničitý

U<sub>eff</sub> – Efektivní napětí

# 1. Úvod

Cévní onemocnění patří mezi nejčastější příčiny smrti v dnešní době. I přes to, že na trhu se nachází mnoho cévních náhrad, jejich použití má jisté nedostatky a omezení. Problémové jsou především nízkoprůtokové tepny, kde umělé implantáty zcela selhávají. Z toho důvodu stále probíhá výzkum nových materiálů a technologií, které by bylo možno použít a tím zvýšit jak počet úspěšných operací, tak i kvalitu péče o pacienta. Postupy tkáňového inženýrství se v tomto ohledu jeví velmi nadějně. Jedna z jeho oblastí se zabývá výrobou tkáňových nosičů pro přípravu cévních náhrad tvořených buňkami vlastního organismu.

Vhodným materiálem pro výrobu tkáňového nosiče jsou polymerní nanovlákná připravená metodou elektrostatického zvlákňování na válcový kolektor. Jejich struktura do značné míry připomíná strukturu mimobuněčné hmoty, díky čemuž jsou ideální k pěstování tkáňových buněk.

Cílem této práce bylo seznámení se s problematikou výroby cévních tkáňových implantátů, prostudování literatury a vypracování literární rešerše. Součástí praktické části byl návrh zařízení, polymerů a polymerních roztoků pro laboratorní výrobu tkáňových cévních implantátů, příprava vzorků a analýza jejich struktury a vlastností.

Bylo sestrojeno zařízení na výrobu tkáňových nosičů a také připraveno několik vzorků nanovlákných tkáňových nosičů z poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu). Byla analyzována jejich struktura a také byly provedeny testy jejich pevnosti v tahu na trhačce.

V druhé polovině praktické části byly analyzovány vzorky polyvinylbutyralu připravené zcela novou metodou, střídavým elektrostatickým zvlákňováním. Podařilo se zhodnotit, především kvalitativně, rozdíly mezi metodami stejnosměrného a střídavého elektrostatického zvlákňování a srovnat vnitřní strukturu vzorků připravených těmito metodami. Dále se našemu týmu podařilo celkově zdokonalit tuto novou technologii, o níž se domníváme, že by se dala využít, mimo jiné, i k výrobě tkáňových nosičů pro cévní náhrady.

Práce je dělena na teoretickou a experimentální část. Teoretická část se zabývá oběhovou soustavou. Popisuje se zde zejména prostředí oběhové soustavy a jednotlivých orgánů se zaměřením na charakteristiku struktury cévní stěny. Následuje popis implantátů používaných v současnosti v chirurgické praxi včetně výčtu jejich nevýhod. Pokračuje kapitolou o mimobuněčné hmotě, její struktuře a funkci, na kterou navazuje kapitola o tkáňovém inženýrství. Ta popisuje metody tkáňového inženýrství a jeho možnostmi a dále se zaměřuje na tkáňové nosiče a vlastnosti, které my měl splňovat. Následuje kapitola o nanotechnologiích. Kromě základních informací o nanotechnologiích a nanovlákních přibližuje proces elektrostatického zvlákňování a jeho modifikaci - elektrostatické zvlákňování na válcový kolektor. Poslední kapitola má za cíl shrnout

vlastnosti, které by měl mít materiál používaný pro výrobu tkáňového nosiče, a polymery a dále ukazuje, které polymery se používají v praxi.

Experimentální část můžeme rozdělit na dvě poloviny. První se věnuje výrobě tkáňových nosičů z poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu). Součástí je popis použité aparatury, příprava roztoků, charakteristiky vnitřní struktury scaffoldů a hodnocení jejich mechanických vlastností. Druhá polovina popisuje přípravu vzorků polyvinylbutyralu metodami stejnosměrného a střídavého zvlákňování a dále analýzu a porovnání jejich vnitřní struktury. Dále pak popisuje proces střídavého elektrostatického zvlákňování, kde jsou vlákna navíjena na rotující válcový kolektor a analýzu takto připravených vzorků.

## 2. Teoretická část

Výroba tkáňových nosičů pro cévní implantáty je komplexní záležitostí. V rámci teoretické části své bakalářské práce se budu zabývat různými aspekty této problematiky, základní charakteristikou oběhové soustavy člověka, strukturou cévy a také charakteristikou cévních implantátů používaných v současnosti. Další kapitoly se týkají tkáňového inženýrství, struktury a funkcí mimobuněčné hmoty a poté samotného procesu výroby – elektrostatickým zvlákňováním, jeho modifikacemi a také materiály, které se k tomuto účelu používají.

### 2.1. Oběhová soustava

Oběhová soustava je orgánová soustava, jejímž hlavním úkolem je transport kyslíku a živin a jiných látek, odvod odpadních látek z těla a rozvod tepla. Skládá se ze srdce, které celou soustavu pohání, krve, která slouží jako přenosové médium, a cév, které ji rozvádí.

#### 2.1.1. Srdce

Srdce je dutý orgán kuželovitého tvaru umístěný v levé polovině hrudníku mezi plícemi a hrudní kostí, který zajišťuje proudění krve v cévách. Skládá se ze dvou předsíní a dvou komor a je tvořeno příčně pruhovaným svalstvem, které nelze ovládat vůlí. Je vyživováno levou a pravou věnčitou tepnou. Průměry těchto tepen se u výstupu z aorty (tedy v nejširším místě) pohybují, v závislosti na různých aspektech, kolem hodnoty 3,6 mm [1]. Při snížení průtoku krve (obvykle kvůli ateroskleróze), nastává tzv. *ischemická choroba srdeční* [2].

#### 2.1.2. Krev

Krev je tělesná tekutina zajišťující samotnou látkovou výměnu. Krev se skládá z krevní plazmy a krevních tělísek přibližně v poměru 1:1.

Krevní plazma je tekutá část krve a obsahuje 91% vody a 9% rozpuštěných látek – různé bílkoviny, soli, glukózu, močovinu, hormony, vitamíny, enzymy. Krevní tělíska jsou červené a bílé krvinky a krevní destičky. Červené krvinky zajišťují samotný přenos kyslíku, bílé krvinky jsou důležitou součástí imunitního systému a krevní destičky se podílí na mechanismu srážení krve [3].

### 2.1.3. Cévy

Z levé komory srdce vystupuje aorta, ze které se postupně oddělují menší tepny. Ty se dále větví na tepénky a vlasečnice, které následně přecházejí na žilky a žíly a sbíhají se zpět do srdce. Zatímco průměr vzestupné aorty je 26-30 mm, u velkých tepen je jen 8-10 mm, dále klesá v jejich větvích na 3-5 mm a u tepének poté na 0,6 mm až na hodnoty 0,009 mm u kapilár [4]. Stěna cévy se skládá ze tří vrstev, přičemž každá vrstva má svou specifickou strukturu a funkci. *Obrázek 2* znázorňuje strukturu cév a také poukazuje na rozdíly mezi tepnou a žílou.

Vnitřní vrstva se nazývá tunica intima. Intimu tvoří jednovrstvá plocha *endotelu*. Jedná se o ploché buňky uspořádané ve směru toku krve. Intima poskytuje hladký povrch a zabraňuje adhezi krevních destiček a bílých krvinek k povrchu cévy. Současně však přes tuto vrstvu probíhá transport látek, a to aktivně i pasivně, a také vylučování různých specifických molekul. Od střední vrstvy je oddělena membránou (tzv. bazální laminou) tvořenou *kolagenem* typu IV, *lamininem* a *fibronektinem* [5].

Střední vrstva (tunica media) tvoří nejtlustší část stěny cévy a je odpovědná za většinu mechanických vlastností. Je tvořena několika vrstvami *hladkých svalových buněk*, *kolagenem* typu I a III, vlákny *elastinu* a různých proteoglykanů. Díky elastinu je céva pružná, zatímco kolagen zabraňuje přílišnému natažení. Buňky a mimobuněčná hmota jsou uspořádány v soustředných vrstvách, a tak tvoří komplexní strukturu, která umožňuje zachovat průsvit cévy při jejím ohybu [5].

Vnější vrstva (tunica adventitia) se skládá z *fibroblastů*, náhodně uspořádaných vláken *kolagenu* (typ I), *elastinu* a nervů. Také se podílí na mechanických vlastnostech, převážně ukotvením k okolní tkáni [5].

Rozlišujeme tři druhy cév. Tepny, žíly a vlasečnice. Jejich struktura má podobné rysy, přesto se liší v závislosti na jejich účelu.

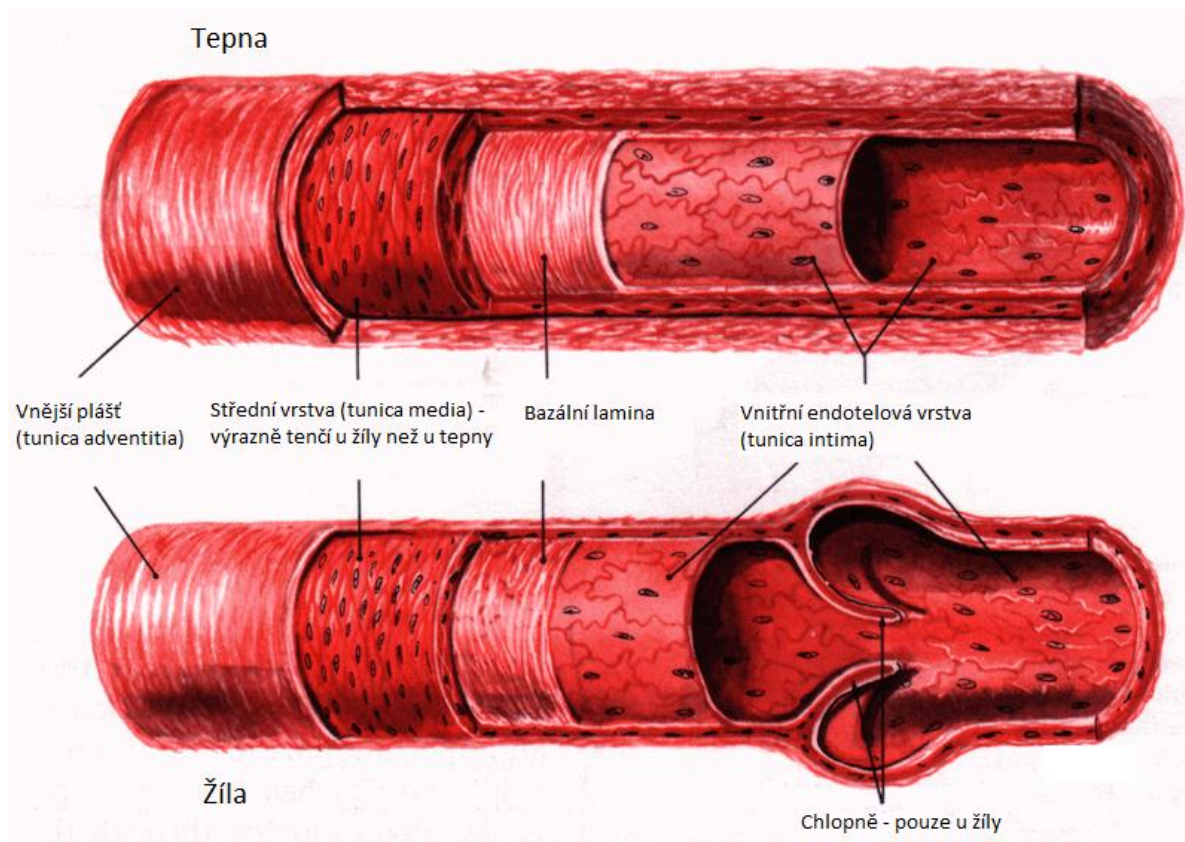
#### **Tepny**

Tepny vedou krev ze srdce, jsou tedy vystaveny většímu tlaku než žíly. Proto mají velmi pevnou a pružnou stěnu, silně vyvinuta je především *tunica media*. Tlakem se tepna rozšíří a až poté vypudí krev dál. Proud krve je proto rovnoměrný, i když srdce mezi jednotlivými stahy odpočívá. Toto roztažení můžeme u povrchových tepen nahmatat jako pulz [4].

#### **Žíly**

Žíly vedou krev do srdce. Jejich stěna je tenčí a méně pružná a tlak uvnitř je menší než v

tepnách (*intima media* je tenčí). Na rozdíl od tepen mají chlopně, které zabraňují zpětnému toku krve [4].



Obrázek 1: Porovnání struktury tepny a žíly. Na obrázku můžeme vidět, že *intima media* u žíly je tenčí, než u tepny. Žíly mají navíc chlopně. Zdroj: <http://adapaproject.org/bbk/tiki-index.php?page=Leaf%3A+What+are+the+main+components+of+circulatory+systems%3F>

### Vlásečnice

Vlásečnice jsou nejtenčí cévy a propojují tepny a žíly. Jejich průměr může být až 0,009 mm [4]. Jejich stěnu tvoří jednovrstvý *epitel*. Skrze jejich stěnu dochází k látkové výměně.

## 2.2. Implantáty používané v současnosti

V dnešní době se používá několik druhů cévních implantátů. V současnosti klinicky používané náhrady lze rozdělit na biologické a umělé. Další informace obsažené v této kapitole, pokud není uvedeno jinak, jsou převzaty z knihy *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění* Krajíčka a kol. [4].

### 2.2.1. Biologické cévní náhrady

Biologické cévní náhrady jsou obvykle vhodným řešením pro cévní rekonstrukce, problém je však s jejich získáváním. Můžeme sem řadit autotransplantáty (pochází z vlastního organismu), alotransplantáty (ze stejného živočišného druhu) a xenotransplantáty (z jiného živočišného druhu). V praxi se však používají převážně autotransplantáty, jelikož u ostatních dochází k imunitní reakci organismu a odmítnutí transplantátu.

#### *Tepenné autotransplantáty*

Tepenný autotransplantát je v podstatě ideální náhrada pro cévní rekonstrukce. Při šetrném odběru a implantaci se náhrada chová prakticky stejně jako původní tepna a histologicky se po přechodném zesílení intimy přizpůsobí.

Jediným problémem je její získávání v potřebných rozměrech. Všechny větší tepny jsou v zásadě důležité pro daný orgán a nelze je bez následků odebrat. Bylo navrženo několik postupů, jak rozšířit, či prodloužit kratší/užší tepnu, ale v praxi se neosvědčily. Dále se nabízí *arteria linealis* v případě provedené *splenektomie*, ovšem pro pacienty se zdravou slezinou je to nepřijatelný postup.

Další komplikací bývá to, že většina cévních rekonstrukcí se provádí u pacientů s *aterosklerózou*, která však nepostihuje jen jeden úsek tepny, ale všechny. To může vést k dalším komplikacím. Obecně jsou tedy tepenné autotransplantáty zastoupeny rovnocenně s autotransplantáty žilními.

#### *Žilní autotransplantáty*

Žilní *autotransplantáty* se používají převážně při rekonstrukcích s očekávaným nízkým průtokem nebo jako náhrada za umělou cévní protézu, která byla odstraněna pro infekci. Jejich použití je omezeno jednak individuální dosažitelností a také jejich rozměry – délkou a průsvitem.

Nejobvyklejším zdrojem je *vena safena magna*, případně *vena saphena parva*. Jejich zásadní výhodou je, že jsou dobře přístupné. Odebírají se jen zdravé žíly, případně jen zdravé úseky.

Žilní *autotransplantáty* se mohou – i přes rozdílnou strukturu – použít pro koronární rekonstrukce. Při přechodu ze systému nízkotlakého do vysokotlakého v nich dochází ke změnám histologickým i mechanickým. Postupně se naruší endotel, objeví se otok intimy a následná *hyperplazie medie a adventicie*. Dochází k výrazné *proliferaci* pojivové tkáně a úbytku původních elastických vláken a také k částečné obnově cév zajišťujících výživu stěny původní tepny. Céva se



postupně rozšíří a přizpůsobí vnitřnímu tlaku.

### **2.2.2. Cévní náhrady umělé**

Umělé cévní náhrady můžeme rozdělit podle technologie výroby na pletené, tkané a lité. Protézy pletené a lité mají srovnatelné vlastnosti, technologie tkaní je spíše na ústupu. Přestože při náhradách velkých cév jsou velmi úspěšné, u cév s nízkým průtokem a menším průměrem (< 6 mm) [6] tyto náhrady selhávají a místo nich se (pokud je to možné) používají žilní autotransplantáty.

#### ***Cévní protézy pletené***

Technologie pletení spočívá v užití dvou či více nití a jehliček. Užitím různých vláken a jehliček lze měnit výsledné vlastnosti protézy. Jako materiál se používají *polyesterová vlákna*. Pletené protézy se netřepí při přestřižení pod jakýmkoliv úhlem, což umožňuje lepší kvalitu spoje protézy s cévou než u protéz tkaných. Povrch pletené cévy se pro dočasné snížení porozity impregnuje *kolagenem*, želatinou nebo albuminem. Tato vrstva se postupně vstřebává.

#### ***Cévní protézy tkané***

Výroba spočívá v tom, že se do osnovy paralelně uložených vláken vetkává člunkem jedno vlákno příčně. K výrobě se používají *teflonová vlákna*. Hlavní výhoda spočívá v možnosti odstupňovat hustotu tkaniny a vytvoření hustého úpletu, takže nedochází ke krvácení cévní stěnou ani u plně *heparizovaných* pacientů. Na druhé straně to však značně ztěžuje proces vhojení. Další nevýhodou je třepení okrajů při přestřižení, což komplikuje následné vytvoření spoje.

#### ***Cévní protézy lité***

Strukturu litých protéz tvoří vlákna, ale amorfní polytetrafluorethylen (PTFE), který je lisován do forem. Tato protéza má mikroporézní strukturu houbovitého charakteru. Mikropóry jsou podbuněčných rozměrů a navíc nejsou vzájemně propojené. Pokud není protéza druhotně upravena, objevuje se po obnovení krevního proudu v otvorech podél stehů obtěžující krvácení. Tomu lze předejít používáním speciálního šicího materiálu.

## 2.3. Mimobuněčná hmota

Tkáň se skládá ze dvou hlavních komponent – z buněk a *mimobuněčné hmoty* (*extracellular matrix, ECM*), přičemž ECM zaujímá většinu objemu tkáně a současně z velké části určuje její geometrický tvar. Ze strukturního pohledu se jedná o komplexně uspořádané *proteiny* a *polysacharidy* jako je kolagen, *elastin*, *kyselina hyaluronová*, *proteoglykany* a *glykosaminoglykany*. Tyto komponenty jsou stále syntetizovány, vyměšovány, orientovány a různě modifikovány buňkami. Základ struktury tvoří *kolagenová* a *elastinová* vlákna v rozměrech od 50 do 500 nm. Dnes již víme, že ECM není jen struktura držící buňky pohromadě. Tato struktura se přímo podílí, prostřednictvím interakcí s receptory na povrchu buněk, na jejich adhezi, migraci, růstu, *diferenciaci* a *apoptóze*. Má také vliv na aktivitu *cytokinů* a mezibuněčných signálů [5].

Interakce mezi buňkami a ECM jsou zásadní během vývoje tkáně, ale i při zacelování poranění a pro zachování její základní funkce. Během vývoje tkáně jsou tyto interakce odpovědné za formování její struktury. Při procesu hojení řídí tvorbu sraženiny, zánětu, granulaci tkáně a následnou přestavbu [5].

Počáteční přitahování a adheze mezi buňkou a ECM jsou způsobeny jednak rozdílnou afinitou a zároveň *hydrofobními interakcemi*. Během další fáze adheze se buňka přichytí k ECM přes *integriny* – proteiny, které se naváží na specifická místa molekuly ECM. To buňce umožní navázat se přes tzv. *fokální adhezi* a tím zajistit přímou komunikaci s ECM [5].

## 2.4. Tkáňové inženýrství

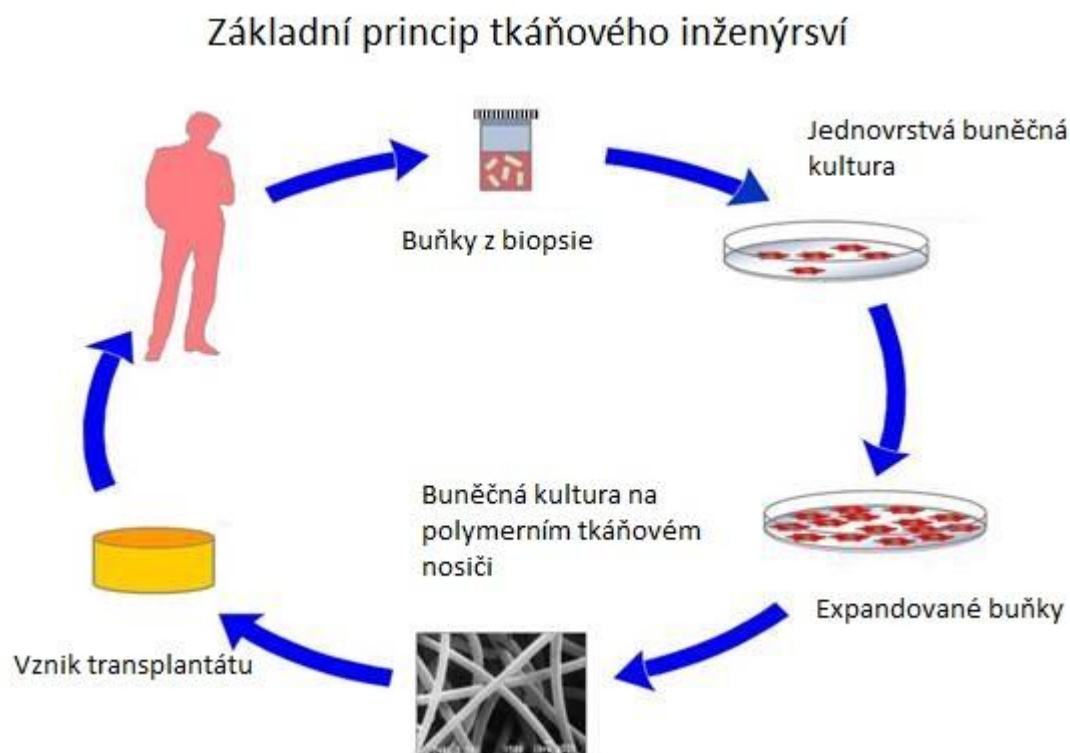
Tkáňové inženýrství je obor, jehož cílem je tvorba, oprava, případně náhrada tkání a orgánů použitím kombinace buněk, biomateriálů, případně biologicky aktivních molekul. Touto cestou se pokouší vytvořit materiál co nejvíce podobný původní tkáni. Je možné, že tento slibný obor zcela změní současnou terapii a výrazně zlepší kvalitu života mnoha pacientů [5].

Potenciálem tkáňového inženýrství je příprava imunologicky tolerantních umělých orgánů a tkáňových náhrad, které se mohou stát živou součástí pacienta. To může vést k trvalému řešení náhrady poškozených tkání a orgánů bez potřeby dalších doplňujících terapií, což je výhodnější jak z hlediska zdravotního, tak po stránce finanční [7].

Jedna ze základních metod tkáňového inženýrství, kterou znázorňuje *Obrázek 2*, zahrnuje vypěstování buněk *in vitro* do požadovaného tvaru. Bohužel samotné buňky nemají schopnost vytvářet takovéto struktury a tím definovat anatomický tvar tkáně. Místo toho zaujmou tvar dvoudimenzionální vrstvy buněk. Nicméně 3D struktury lze dosáhnout nasazením buněk do porézní matrice – tzv. tkáňového nosiče (jinak také scaffold), ke kterému se buňky dokáží přichytit,

kolonizovat ho a tím získat požadovaný. Scaffold tedy vlastně nahrazuje původní mimobuněčnou hmotu. Takto vytvořenou strukturu je poté možno použít jako náhradu kosti, chrupavky, cévy, kůže, svalů, apod. Tkáňový nosič je tedy velmi důležitým prvkem tohoto oboru [7].

Obrázek 2: Základ tkáňového inženýrství: Buňky se odeberou od pacienta (tzv. biopsie), napěstují se



*in vitro*, poté se nanesou na tkáňový nosič. Vzniklý transplantát může být voperován zpět do těla pacienta. Zdroj: <http://www.experimentation-online.co.uk/article.php?id=1141>

#### 2.4.1. Tkáňový nosič

Většina současných technik spoléhá na makroporézní tkáňové nosiče, které slouží jako podpora pro počáteční přichycení buněk a následnou formaci tkáně. Tento postup se dá dobře aplikovat na tvorbu jednodušších struktur. Spoléhá na přirozené schopnosti buněk a na regenerační schopnosti tkání. Proto v tomto případě záleží hlavně na samotných buňkách a jejich schopnosti přizpůsobit se. V každém případě, schopnost přizpůsobit se okolnímu prostředí má jisté hranice, což je jedním z důvodů, proč tkáňové inženýrství zatím nedokáže obnovit některé tkáně. Jedním z největších problémů současných postupů tkáňového inženýrství je, že nedokáží vytvořit strukturu,

která by umožňovala pronikání kyslíku a živin do celé struktury scaffoldu [5].

V poslední době jsou vyvíjeny scaffoldy nového druhu, scaffoldy, které umožňují získat kontrolu nad uspořádáním buněk, jejich organizací a interakcemi a tím přispět k lepší imitaci struktury tkáně. Velký podíl na tom má současný technologický rozvoj v oblasti nanotechnologií. Nanotechnologie jednak umožňují ovládat strukturu materiálu na škále mikro a nanometrů a také s sebou přináší kvalitnější možnosti analýzy. Z tkáňového nosiče tak přestává být jen pasivní substrát pro adhezi buněk a jejich proliferaci. Namísto toho se může (díky své struktuře) aktivně zapojit do procesu vývoje tkáně [5].

Jednou z nadějných cest designu nového scaffoldu je co nejbližší napodobení chemických vlastností, případně struktury původní mimobuněčné hmoty a tím zajistit co nejlepší prostředí pro buňky. Díky zahrnutí její architektury a chemických aspektů může takový scaffold podporovat adhezi buněk a *proliferaci*, poskytovat biologické signály, umožnit dostatečný přísun živin a poskytnout mechanické a biologické vlastnosti ovlivňující funkci buněk. Samozřejmě je možné dosáhnout nových vlastností, jiných než má mimobuněčná hmota, například modifikací povrchu, nebo přidáním kontrolovaného uvolňování různých aktivních látek. Přesto je přírodní mimobuněčná hmota velmi dobrým vzorem [5].

Jednou z metod, kterou lze použít, je elektrospining, metoda výroby nanovláken, která jsou rozměrově velice blízká vláknům kolagenu a elastinu ECM.

## **2.5. Nanotechnologie pro výrobu tkáňových nosičů**

V této kapitole se zaměřím na nanotechnologie a především na samotný proces elektrostatického zvlákňování a jeho modifikace.

### **2.5.1. Nanotechnologie**

Nanotechnologie se dají definovat různě a definic je značné množství. Pro představu jsem vybral definici od National Science Foundation [8]: Nanotechnologie představují výzkum a technologický vývoj na úrovni atomů, molekul a makromolekul, v rozměrech přibližně 1nm až 100 nm, poskytující pochopení úkazů a materiálů na úrovni nanometrů a vytváření a užívání struktur, přístrojů a systémů, které vykazují nové vlastnosti a funkce, díky jejich velikosti. Nové, odlišné vlastnosti a funkce jsou vyvíjeny v typické škále pod 100 nm. Nanotechnologický výzkum a vývoj zahrnuje kontrolovanou manipulaci struktury na úrovni nanometrů a její integraci do větších materiálových komponentů, systémů a architektur. Ovládání a konstrukce jejich struktury a

komponentů zůstává stále ve škále nanometrů. V některých zvláštních případech může být kritická délka menší než 1 nanometr – například při manipulaci s jednotlivými atomy (pod 1 nm), případně větší – například polymery posílené nanočásticemi, kde se kritická délka může pohybovat mezi 200 a 300 nm.

I přes to, že se jedná o relativně mladý obor, má v dnešní době již značné množství aplikací. V textilním průmyslu se používají nanočástice stříbra, které díky svým antibakteriálním účinkům zabraňují zápachu. Oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ) se používá na výrobu nesmáčivých dlaždic a skla. Nanočástice železa nacházejí své využití pro čištění odpadních vod. Do kosmetických přípravků, jako jsou krémy na obličej a krémy na opalování, se přidávají nanočástice oxidu titaničitého a oxidu zirkoničitého, rtěnky a líčidla obsahují nanočástice oxidu železitého ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Nanovrstvy  $\text{TiO}_2$  se také používají na výrobu laků s reflexními vlastnostmi. V automobilovém průmyslu se využívá kompozitu polymer – jíl pro zvýšení pevnosti různých materiálů. Další využití je v oblasti elektroniky a informačních technologií [9]. V neposlední řadě je tu nanospider – jedinečný český patent firmy Elmarco – přístroj pro komerční výrobu nanovláken, která nacházejí využití například v oblasti filtrací.

### 2.5.2. Nanovlákná

Podle definice je za „nano“ považováno takové vlákno, které má průměr menší než 100 nm. Přesto jsou názory na tuto hodnotu nejednotné a převážně komerční subjekty, jako [10], [11], [12] berou za hraniční rozměr 0,5  $\mu\text{m}$ , nebo i 1  $\mu\text{m}$ . Faktem je, že již vlákna s průměrem pod 1  $\mu\text{m}$  mohou vykazovat nové vlastnosti. Navíc pro naše účely jsou ideální vlákna o průměrech 50 až 500 nanometrů. Budu tedy za hraniční rozměr považovat 1  $\mu\text{m}$ .

V dnešní době existuje několik metod výroby nanovláken, elektrospinning je však zatím jedinou metodou, která se využívá průmyslově. Dalšími metodami jsou *tažení*, *meltspinning*, *self-assembly*, *template synthesis*, *elektroblowing* a *forcespinning* [13].

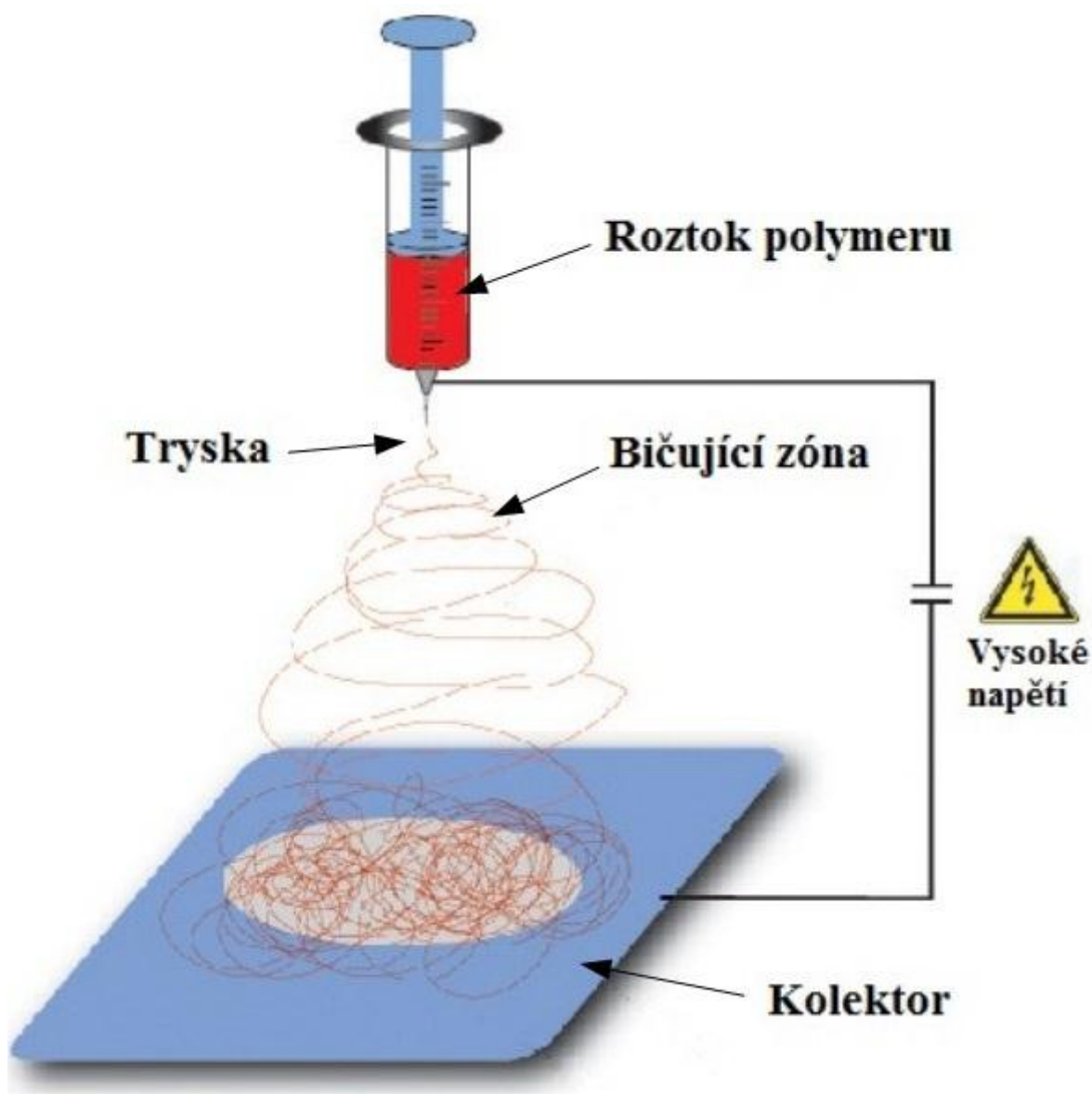
Nanovlákná mají mnoho specifických vlastností, které je odlišují od běžných materiálů. Jenou z nich jsou jejich typické rozměry. Pro srovnání, vlákna vyrobená technologií *meltblown* nebo *spunbond*, mají průměr od 0,9 až do několika mikrometrů [10]. Průměr nanovláken může být tedy více než 10 krát menší. Nanovlákná se také vyznačují velkým měrným povrchem a porózitou s malou velikostí pórů, díky níž se mohou používat například jako filtrační médium [13].

### 2.5.3. Elektrostatické zvlákňování

V současnosti je elektrostatické zvlákňování (elektrospinning) nejvhodnější metodou výroby nanovláken. Proces výroby je již technologicky značně propracovaný a tak se využívá i pro průmyslovou výrobu nanovláken (například pro výrobu filtrů). Dají se takto připravit vrstvy nanovláken o průměru v rozmezí přibližně 50 – 900 nm [14].

*Obrázek 3* znázorňuje schéma aparatury pro elektrostatické zvlákňování. Roztok polymeru je umístěn v injekční stříkačce, ke které je ze zdroje přivedeno vysoké napětí. Naproti injekční stříkačce je umístěn kolektor. Kolektorem může být například deska nebo váleček, který je buďto uzemněný, nebo je na něj přivedeno napětí opačné.

Ve chvíli, kdy je k polymeru přivedeno dostatečné napětí, začne samotný proces zvlákňování. Kapka polymeru se vytáhne do tzv. Taylorova kužele, z jehož vrcholu vychází proud polymeru (tryska). Průměr vláken směrem ke kolektoru stále klesá působením elektrického náboje. Vlákná se pokouší co nejvíce zvětšit svůj povrch, díky provázání řetězců polymeru však vznikají vlákná a ne kapky. Vlákná dopadají na povrch kolektoru, kde vytvoří tenkou vrstvu. V následujících podkapitolách se pokusím podrobněji přiblížit jednotlivé fáze a podstatu tohoto procesu. Další informace obsažené v této kapitole, pokud není uvedeno jinak, jsou převzaty z Andradyho monografie *Science and technology of polymer nanofibers* [14].



Obrázek 3: Schéma aparatury pro elektrostatické zvlákňování Zdroj: <http://www.nicast.com/index.aspx?id=2910>

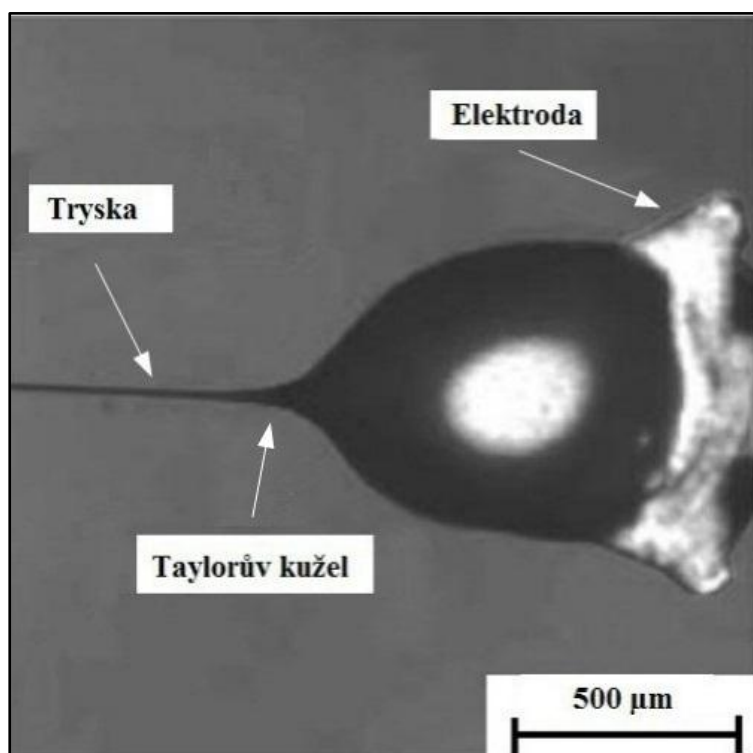
### ***Vznik Taylorova kuželu***

Relativně malé, elektricky nabitě kapky je možno deformovat pomocí elektrického pole. Efekt se snižuje se zvyšujícím se poloměrem kapky, protože elektrické pole slábne s druhou mocninou vzdálenosti. Kapka polymeru (kvůli zapletení řetězců) v elektrickém poli zaujímá tvar kužele. Tento tzv. Taylorův kužel (Obrázek 4) vzniká, když je přesažena hodnota tzv. kritického napětí. Hodnota kritického napětí závisí na různých podmínkách, jako je druh polymeru, vzdálenost kolektoru, teplota a vlhkost vzduchu. Z konce Taylorova kužele následně vystřelí tenký proud

polymeru směřující ke kolektoru, tzv. tryska.

### ***Fáze trysky***

V této fázi se polymerní tryska snaží zvětšit svůj povrch, aby se přizpůsobila elektrickým silám, které na ni působí, čímž se zmenšuje poměr povrchového náboje na jednotku povrchu. Tryska se objevuje téměř okamžitě po překročení kritického napětí. S rostoucí vzdáleností od Taylorova kužele se zvyšuje její rychlost a současně klesá průměr, kvůli jejímu prodlužování a vypařování rozpouštědla. Postupně se tedy zvětšuje povrch trysky na jednotku její hmotnosti, zatímco povrchový náboj na jednotku povrchu klesá. K poklesu náboje přispívá také kontakt s nabitými částicemi vzduchu.



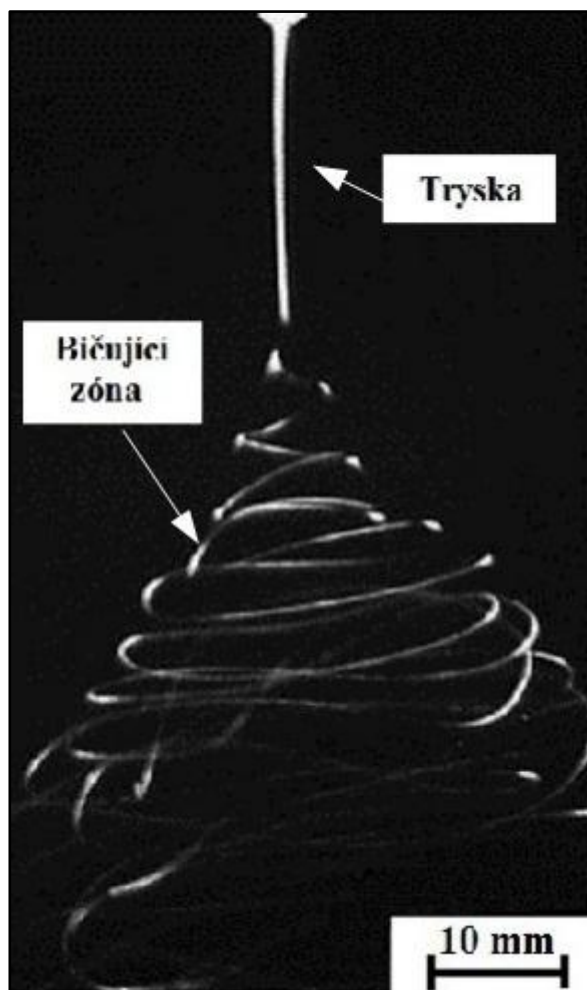
*Obrázek 4: Na obrázku je zachycen polymer deformovaný elektrickým napětím. Vytváří Taylorův kužel, z jehož konce vychází proud polymeru - tzv. tryska Zdroj: [13]*

### ***Oblast bičující nestability***

Zpočátku rovná tryska přestává být stabilní, začíná se ohýbat a vlnit. Ohyb trysky vede k dalšímu zvětšení povrchu, čímž se snižuje povrchový náboj. Teoretické studie modelují bičující



zónu jako výsledek soupeření mezi několika odlišnými nestabilitami. Tato oblast se vyznačuje působením elektrostatických odpuzivých sil, které nejsou z velké části axiální. Proud polymeru



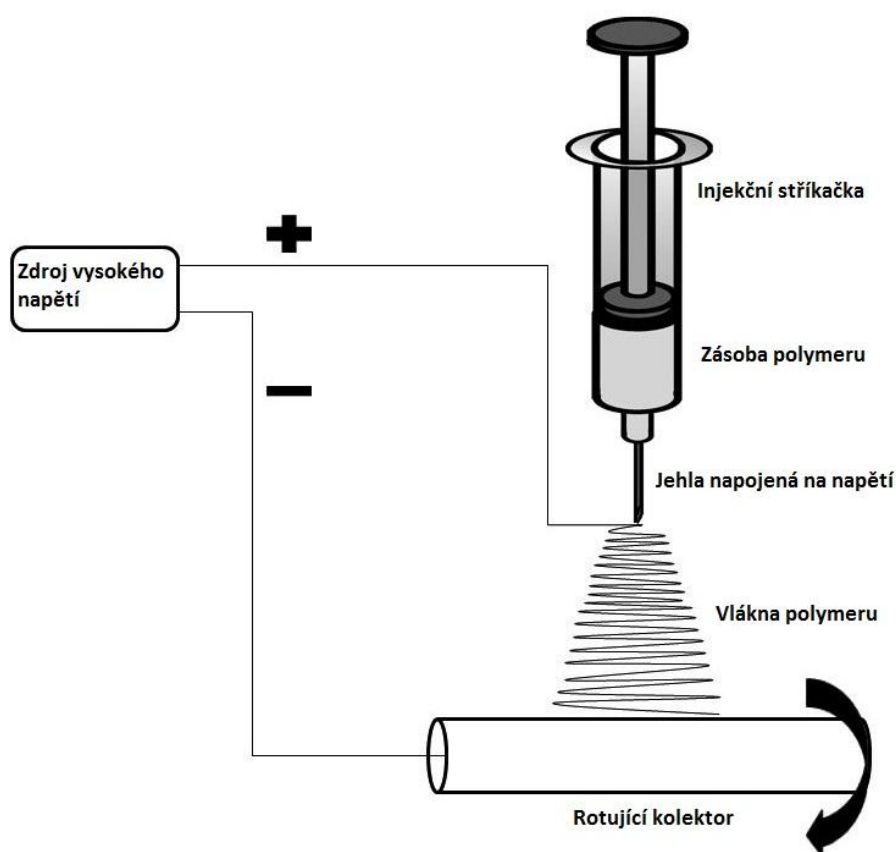
*Obrázek 5: Proud polymeru opisuje smyčky se stále větším průměrem a ve spirálách se blíží ke kolektoru.*

opisuje smyčky se stále větším průměrem a ve spirálách se blíží ke kolektoru. Kužel, který můžeme vidět zde (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), je tvořen rychlým symetrickým pohybem jediné trysky. V této oblasti dochází k nejvýraznějšímu odpařování rozpouštědla a zvětšování povrchu. Bičující oblast je tedy místo odpovědné za samotný vznik nanovláken a její délka ovlivňuje tloušťku získaných nanovláken. Tu lze ovlivnit vzdáleností kolektoru od elektrody.

#### 2.5.4. Elektrostatické zvlákňování na válcový kolektor

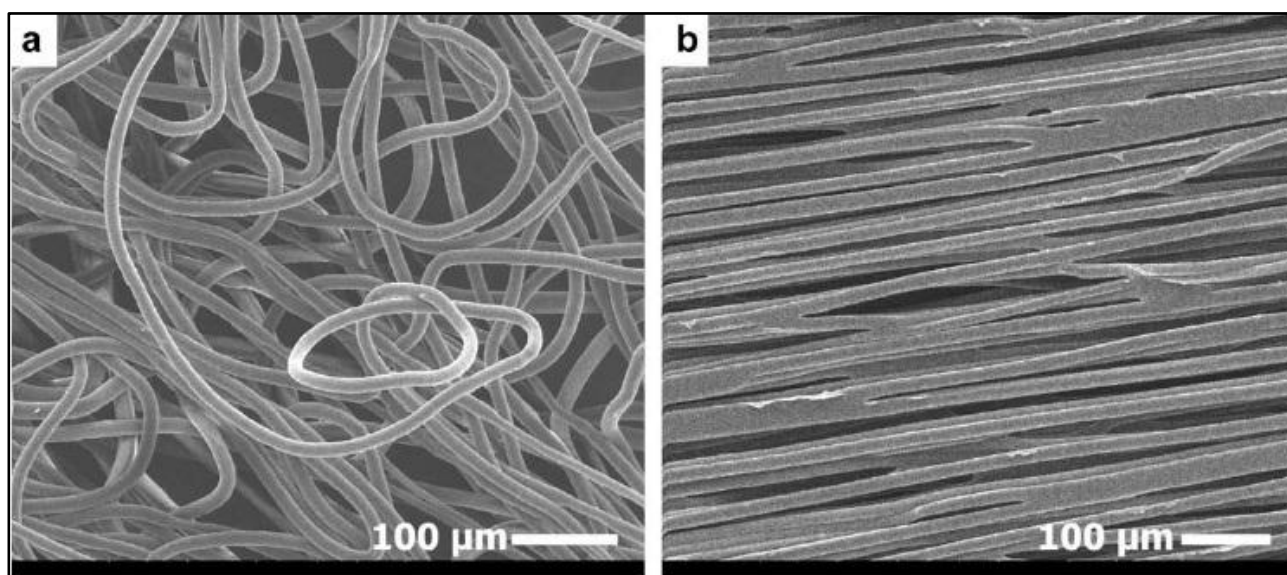
Pokud chceme vyrobit tkáňový nosič, kterým budeme moci nahradit cévu, je třeba, aby měl tvar trubičky. Toho snadno dosáhneme metodou elektrospinningu s válcovým kolektorem (*Obrázek 6*), který popsal a patentoval Formhals již v roce 1934 [15]. Tento postup je velmi vhodný také proto, že současně umožňuje výrobu uspořádaných vláken, pokud je zvolena správná rychlost rotace kolektoru.

Nabité vlákno se při kontaktu s povrchem kolektoru elektrostaticky přichytí a je postupně navíjeno. Pokud je rychlost otáčení dostatečná, narovná se jeho původně spirálovitá trajektorie. Tak vznikají uspořádaná vlákna. Současně může docházet k jejich prodloužení tažením [14].



*Obrázek 6: Schéma aparatury elektrostatického zvlákňování s rotujícím kolektorem. Zdroj: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/alignment-of-cells-and-extracellular-matrix-within-tissue-engineered-s>*

Edwards a kol. [16] prováděl výzkum vlivu rotujícího kolektoru na strukturu nanovláken poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL). Použil 30% roztok PCL v dichlorethanu. Edwards provedl sadu měření při různých rychlostech otáčení a poté hodnotil uspořádání vláken a také jejich vnitřní strukturu. Ukázal, že do rychlosti rotace 2 m/s zůstávají vlákna neuspořádaná (Obrázek 7a). Pokud se rychlost rotace zvýší nad tuto hodnotu, vlákna se dostanou pod mechanické napětí. Dochází k jejich uspořádání a současně prodlužování (Obrázek 7b). Maximální orientace bylo dosaženo při obvodové rychlosti rotace 2,5 m/s. Při překročení obvodové rychlosti 5 m/s docházelo u vláken k narušení vnitřní struktury a vlákna se začala trhat.

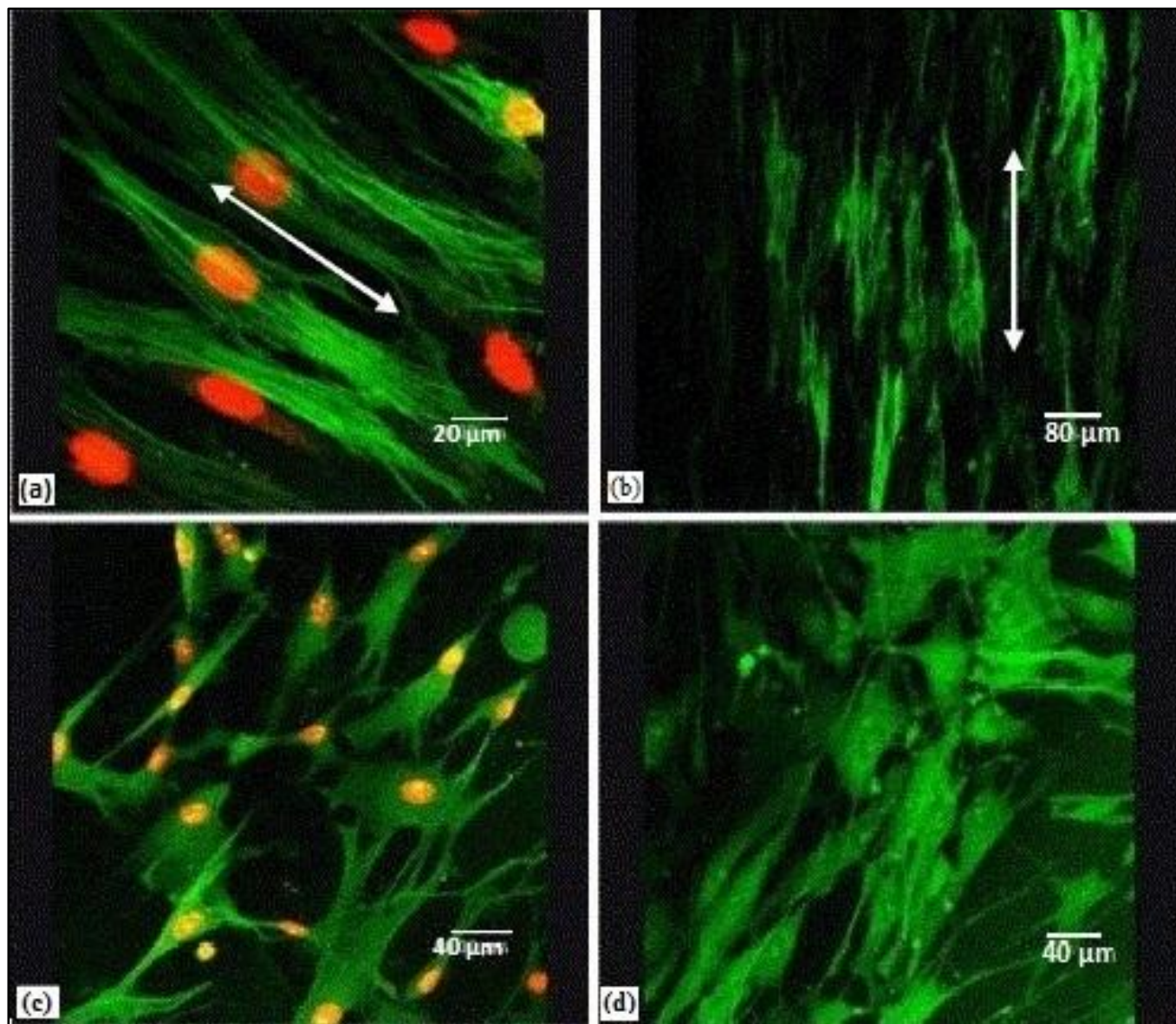


Obrázek 7: Vlákna PCL sbíraná na válcový kolektor při různých otáčkách. Obrázek a) zobrazuje neuspořádanou strukturu při nízkých otáčkách, zatímco u b) byla rychlost dostatečná k vytvoření uspořádané struktury vláken. Zdroj: [15]

Podobnou studii vypracoval Hu a kol. [17]. V této studii byl použit 13% roztok PCL v dichlormethanu (DCM) a N,N-dimethylformamidu (DMF) v poměru 80/20. Největší míry uspořádání vláken zde bylo dosaženo při rychlosti rotace 10,68 m/s, přičemž nedošlo k žádnému poškození vláken. Současně byl zkoumán vliv uspořádanosti vláken na uspořádání nasazených buněk. Buňky se přichycovaly podél vláken a vytvářely pravidelnou strukturu. Struktura vláken má tedy značný vliv na výsledné chování buněk.

Xu a kol. [18] připravil scaffold tvořený uspořádanou strukturou vláken elektrosponingem na válcový kolektor z 5% roztoku kopolymer kyseliny poly(L-mléčné) a poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (P(LLA-CL)) (75:25) v acetonu při rychlosti rotace kolektoru 11 m/s. Vzorky byly posázeny hladkými

svalovými buňkami (SMC) a pozorovány 7 dní. Biologické testy ukázaly, že se buňky přichytávají podél vláken (Obrázek 8a,c). V porovnání se skupinou buněk na kontrolní destičce (Obrázek 8,d) pro tkáňové kultury byla rychlost proliferace srovnatelná, ovšem obě skupiny vykazovaly zcela jiný fenotyp.



Obrázek 8: Srovnání SMC pěstovaných na nanovláčkách (a,b) a na polystyrenové Petriho misce (c,d). Na obrázku a) a c) jsou vidět vlákna aktinu a na obrázku b) a d) vlákna miozinu. Buňky pěstované na nanovláčkách tvoří uspořádaná vlákna, na rozdíl od buněk na TCPS Zdroj: [18]

## 2.6. Polymery využívané pro výrobu tkáňových nosičů

Volba vhodného materiálu pro výrobu tkáňového nosiče je velmi důležitá vzhledem

k množství požadovaných vlastností. Existuje několik polymerů, které se v této oblasti využívají a splňují tyto požadavky (nebo alespoň většinu). Tato kapitola má za cíl ukázat, jaké vlastnosti by měl mít polymer určený pro výrobu tkáňových nosičů. Dále jsou uvedeny polymery používané v praxi a jejich stručná charakteristika.

### **2.6.1. Požadované vlastnosti**

Pokud vytváříme umělou cévu, musíme vzít v úvahu, do jakého prostředí se dostane, jaké vlivy na ni budou působit, případně jak by se měla chovat.

Z biologických vlastností materiálu je samozřejmostí biokompatibilita. Materiál musí umožnit (v ideálním případě podporovat) adhezi buněk, jejich diferenciaci a proliferaci. Obvykle je také požadována biodegradabilita. Biodegradabilní materiál může být postupně odbouráván a nahrazen vlastní ECM. Pokud bude materiál organismem postupně odbouráván, nesmí být jeho výsledné produkty toxické. Navíc je třeba, aby k rozkladu docházelo jen tak rychle, aby buňky dokázaly vyplňovat vzniklý prostor novou tkání.

Cévní náhrada musí mít také vhodné mechanické vlastnosti. Musí být schopná odolat tlaku krve, mít dostatečnou pevnost v tahu, při ohybu se nelámat a zachovávat průsvit. Splnění těchto požadavků klade nároky jednak na mechanickou pevnost, ale také na pružnost.

### **2.6.2. Polymery využívané v praxi**

V praxi byla již vyzkoušena celá řada polymerů, a to přírodních, syntetických nebo jejich kombinací ve formě směsi, kopolymeru, případně vícevrstvého scaffoldu. Podrobnější informace o jednotlivých polymerech je možno najít například v [5], [19].

#### ***Přírodní polymery***

Přírodní polymerní biodegradabilní biomateriály, které by se daly velmi snadno zavést do klinické praxe, jelikož jsou pro tělo přirozené. Buňky s nimi, díky jejich bioaktivním vlastnostem, velice ochotně interagují [7].

Kolagen je nejhojnější protein v lidském těle a hlavní stavební prvek ECM. Zajišťuje integritu a pevnost tkání. Při narušení tkáně (poranění) je kolagenu třeba na opravu a obnovu její

struktury a funkce. Existuje přes 30 druhů kolagenů a pro všechny je společná molekulární struktura trojitě šroubovice. Pro výrobu tkáňových nosičů se obvykle používají kolageny typu I, III a IV.

Sell a kol. ve své studii [20], připravil elektrospinningem kolagenu vlákna rozměrově srovnatelná s ECM. Pro kolagen typu I získal vlákna průměrů od 100 nm do 5  $\mu$ m, pro kolagen typu III vlákna od 115 do 612 nm pro různé koncentrace roztoků. V obou případech byla závislost průměrů vláken na koncentraci roztoku lineární.

Nevýhodou kolagenu je, že ve formě elektrospinnovaných vláken nemá po hydrataci *in vivo* dostatečné mechanické vlastnosti. Bez dalšího zesíťování nedokáže přestát tepenné tlaky. Jednou z variant je jeho zesíťování, druhou možností je elektrospinning kolagenu ve směsi se syntetickým polymerem [20].

Elastin je polymer, běžně zastoupený v cévní tkáni vedle kolagenu. Mechanicky zajišťuje v tkáni pružné vlastnosti. Chemicky je inertní, téměř nerozpustný. Používá se proto jeho rozpustná forma alfa-elastin, případně tropoelastin (z kterého je elastin tvořen). Pro zachování správné funkce u nízkoprůtokových prostředí je třeba, aby tkáňová náhrada odpovídala svými mechanickými vlastnostmi původní tepně. Tropoelastin dokáže poskytnout stavební materiál pro formování elastinových vláken *in vivo*. Zpracování tropoelastinu do cévní náhrady může být proto velmi užitečné. Problém je ovšem stejný jako u kolagenu. Elastin, pokud není zesíťovaný, nevykazuje dostatečné mechanické vlastnosti. Elektrospinning alpha-elastinu a tropoelastinu provedl například Li a kol. [21].

Elektrospinning směsi kolagenu a elastinu provedl Boland a kol. [22]. Vytvořil dvojvrstvý biomimetický cévní scaffold. Vnější vrstva se skládala z kolagenu typu I a elastinu v poměru 80/20 a vnitřní v poměru 30/70. Vnitřní stěnu osázel endoteliálními buňkami, vnější SMC a FB. Tato studie ukázala, že vytvoření biomimetického scaffoldu má velmi pozitivní vliv na chování buněk. Přesto jeho praktickému použití brání absence mechanických vlastností.

### ***Syntetické polymery***

Syntetické polymery jsou obvykle levnější než biologické, jejich zpracování je snadnější a také se lépe skladují. Přitom jejich fyzikálněchemické a mechanické vlastnosti jsou srovnatelné s polymery přírodními. Výhodou je také, že mohou být produkovány pod stálými podmínkami. Jejich vlastnosti jsou předvídatelné a lépe reprodukovatelné. Nejobvyklejší materiály, které se dnes používají, [5] jsou kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymlečná (PLA), jejich kopolymer (PLGA), poly( $\epsilon$ -kaprolakton), polydioxanon (PDO), polyanhydridy, polykarbonáty.

Vaz a kol. [23] připravil elektrospinningem vícevrstvý scaffold na rotačním kolektoru o



průměru 6 mm, kde vrchní vrstva byla složena z pevných, orientovaných vláken kyseliny polymléčné (PLA) a vnitřní vrstva z neuspořádaných vláken poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL). Uspořádanou strukturu PLA se podařilo dosáhnout při zvýšení obvodové rychlosti kolektoru na 3,4 m/s. Struktura vrstvy PCL se vyznačovala mikrovláknky o průměru 1,5 až 6  $\mu\text{m}$  a velikostí pórů v průměru 15  $\mu\text{m}$ . Vláknka vnější vrstvy PLA dosahovala průměru od 800 nm do 3  $\mu\text{m}$  a velikost pórů byla v průměru 10  $\mu\text{m}$ . Takto vyrobený scaffold dosáhl požadovaných mechanických vlastností (značná pružnost) a současně dobře podporoval růst a proliferaci tkáňových buněk.

Výzkum na téma dlouhodobého života hladkých svalových buněk na nanovláknkách kopolymeru kyseliny polymléčné a  $\epsilon$ -kaprolaktonu (*P(LLA-CL)* (70:30) se zabýval Dong a kol. [24]. Hladké svalové buňky byly kultivovány na tkáňovém nosiči po dobu 105 dní, s cílem zhodnotit jejich dlouhodobou životnost a zanalyzovat jejich vliv na degradaci nanovláken. I přes to, že počáteční životnost byla nižší než na polystyrenové destičce pro pěstování tkáňových kultur, po 30 dnech prokázaly buňky životnost větší. Po 2 měsících se již zformovalo několik buněčných vrstev. Dále bylo prokázáno, že buňky dokáží vylučovat vlastní ECM, což je zcela nezbytné, aby mohly nahrazovat materiál nosiče a posilovat celistvost a pevnost struktury.

### ***Směsi přírodních a syntetických polymerů***

Jako jedna z možností, jak zachovat biologické vlastnosti scaffoldu a současně zlepšit jeho mechanické vlastnosti, je využití polymerní směsi polymeru přírodního a syntetického. PCL je biodegradabilní polymer (1 až 2 roky) s výbornými mechanickými vlastnostmi. Právě směs PCL a kolagenu využil ve své práci Lee a kol. [25]. Scaffold tvořený kompozitem PCL a kolagenem typu I dokázal odolávat vysokým tlakům i po delší době a přitom si zachovávat vhodné prostředí pro růst buněk. Dosáhl průměrů vláken kolem 520 nm. Scaffold měl dostatečnou pevnost v tahu, adekvátní elasticitu. Dále byl scaffold také osázen telecími EC zevnitř a SMC z vnější stěny. Buňky vytvořily souvislou vrstvu po celém scaffoldu. Dále byly provedeny testy stability in vivo. Scaffold odolal krevnímu tlaku a vnitřní endotelová vrstva zabraňovala adhezi krevních destiček. Také se ukázalo, že i měsíc po transplantaci si scaffold zachoval svou vnitřní strukturu a biomechanické vlastnosti srovnatelné s reálnou tepnou.

Venugopal a kol. [26] použil směs PCL, kolagen I a III a elektrospínem dosáhl vláken o průměru 210 – 225 nm a mechanických vlastností vhodných pro cévní náhradu. Dále provedl srovnání proliferace SMC na těchto vláknkách a samotných vláknkách PCL. Ukázal, že proliferace na vláknkách typu PCL/kolagen I a III je po 6 dnech vyšší o 82 %.

Lee a kol. [27] připravil scaffoldy ze směsi polymerů přírodních (elastinu (15%) a kolagenu (45%)) s různými polymery syntetickými (40%) Těmi byly *PLLA*, *PLGA*, *PCL* a *PLCL*. Byly připraveny scaffoldy o průměru 4,75 mm délce 12 cm a tloušťce 0,5 mm při obvodové rychlosti kolektoru 0,12 m/s. Byly tvořeny náhodně orientovanými vlákny o průměrech 477 nm až 765 nm. Scaffoldy byly netoxické a rozměrově stálé v prostředí *in vivo*. Tato studie ukazuje, že přítomnost biodegradabilního syntetického polymeru zlepšuje mechanické vlastnosti cévní náhrady. Zároveň však přítomnost elastinu a kolagenu zaručuje lepší biokompatibilitu, než by bylo možno dosáhnout se samotným syntetickým polymerem. Rovněž poukazuje na možnost využití několika různých materiálů s různými mechanickými vlastnostmi, jejichž užitím by bylo možné co nejvíce napodobit vlastnosti původní cévy.

Huang [28], na rozdíl od předchozích autorů, využil kombinaci syntetického polymeru s přírodními pro výrobu vícevrstvého scaffoldu na rotačním kolektoru o průměru 3 mm a rychlosti rotace 0,05 m/s. Jako vnější a vnitřní vrstva sloužila vlákna směsi kolagenu a *chitosanu* (4:1), mezi nimi, jako střední vrstva, byla užita vlákna *P(LLA-CL)*. Scaffold vykazoval lepší mechanické vlastnosti než scaffoldy z vláken polymerních směsí. Bylo prokázáno, že tato struktura má vhodné biologické vlastnosti a příznivě ovlivňuje adhezi a proliferaci buněk i přes to, že proliferace buněk na scaffoldu bez syntetického polymeru byla rychlejší. Monovrstva endoteliálních buněk se zformovala během 1 týdne.



### 3. Experimentální část

Náplní experimentální části bakalářské práce byla výroba tkáňových nosičů a jejich charakterizace. Druhou polovinou je analýza vláken vzniklých střídavým elektrostatickým zvlákňováním.

#### 3.1. Výroba tkáňových nosičů pro cévní implantáty

V rámci této části jsem se podílel na výrobě tkáňových nosičů. Byly připraveny tkáňové nosiče z PCL (*Obrázek 9*) na válcový kolektor při různých rychlostech rotace. Byla analyzována jejich struktura a také jejich mechanické vlastnosti.

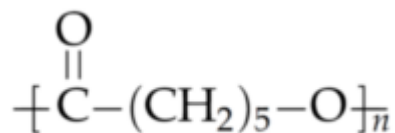


*Obrázek 9: Ukázka scaffoldů, který jsme připravili*

##### 3.1.1. Metody

###### *Použité materiály a příprava roztoků*

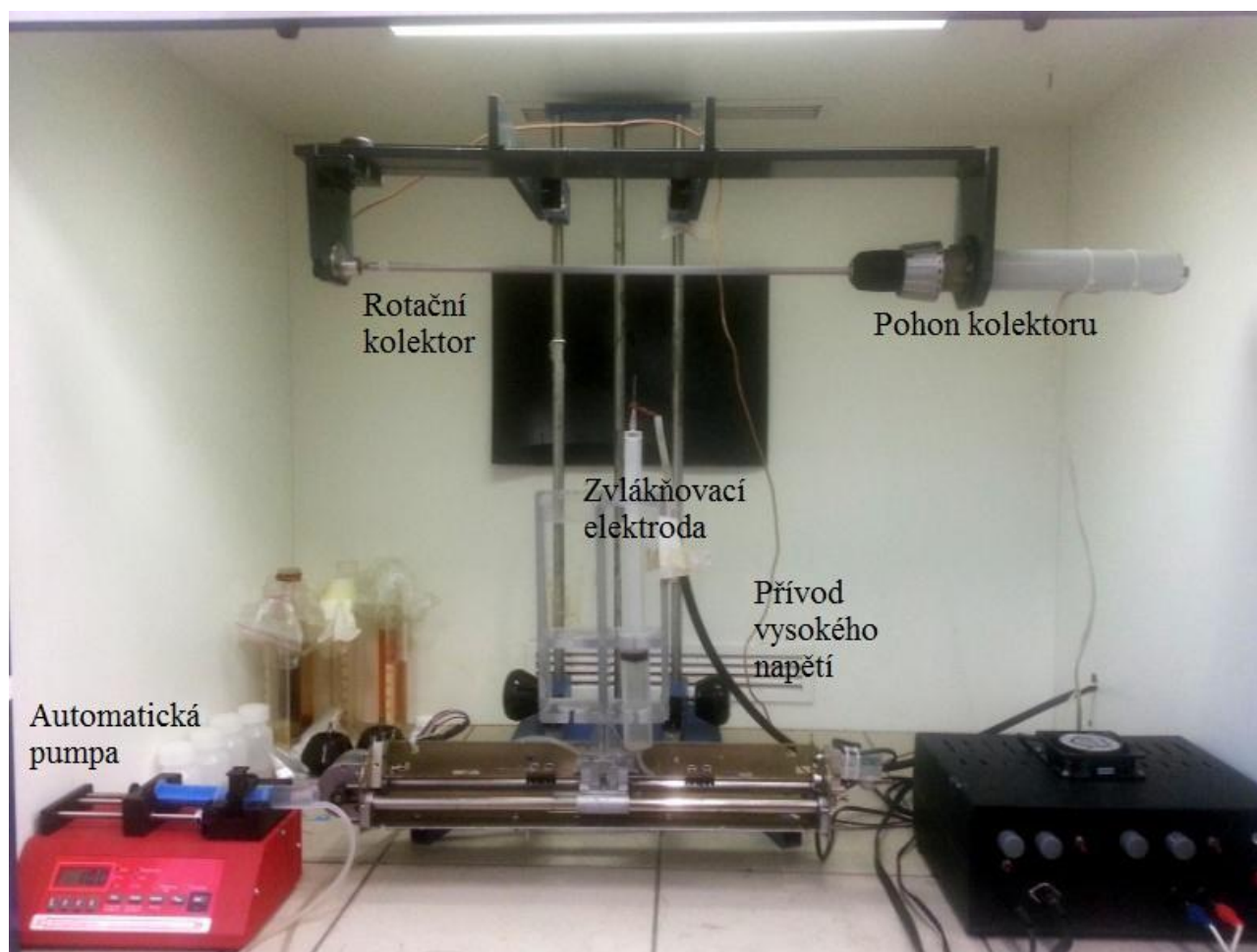
Poly- $\epsilon$ -caprolactone (Mw 40.000, Sigma – Aldrich), rozpuštěný v roztoku chloroform:ethanol v poměru 9:1 (9:1, Sigma – Aldrich), míchán po dobu 8 hodin, aby vznikla homogenní směs. Roztok byl používán nejdéle týden od přípravy.



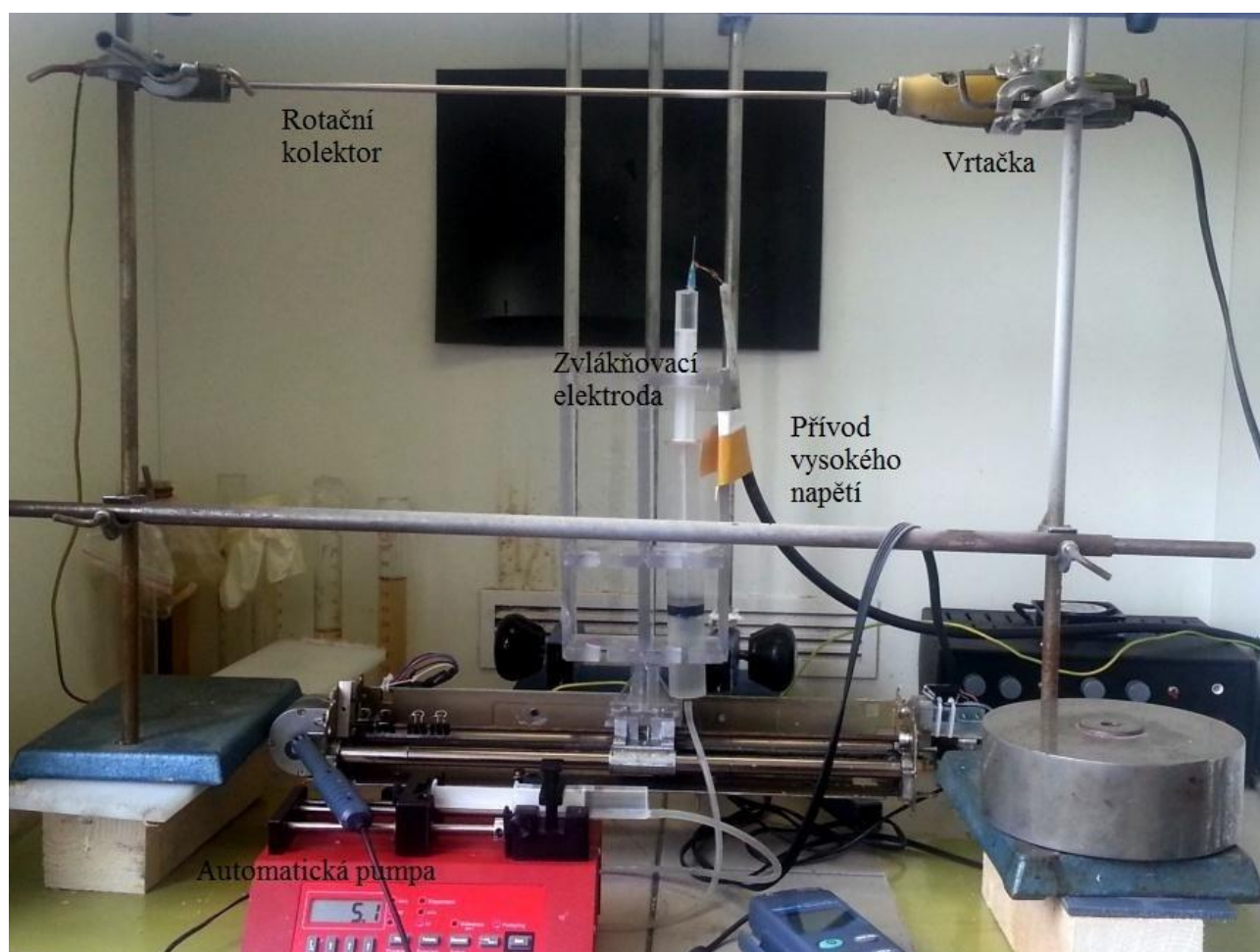
*Poly- $\epsilon$ -kaprolakton, viz [19], str. 361*

## Aparatura

Byla vyrobena aparatura pro elektrospinning s rotujícím kolektorem. Aparatura se skládá ze zdroje vysokého napětí (Matsusada Precision Inc., Japan), automatické pumpy (Model NE-1000x; New Era Pump Systems Inc., USA), 10 ml plastové stříkačky a uzemněného nerezového rotujícího kolektoru (průměr od 3 do 6 mm a délka 20 cm). Jako pohon kolektoru byl použit krokový motor (*Obrázek 10*) (pro výrobu náhodně orientovaných vláken, max. 1250 RPM) a vrtačka (Proxxon MICROMOT 50E) (*Obrázek 11*) (pro výrobu vláken orientovaných, max. 20000 RPM). Aparatura byla umístěna do digestoře kvůli odvodu výparů rozpouštědla.



*Obrázek 10: Aparatura pro elektrostatické zvlákňování s rotujícím kolektorem pro výrobu neorientovaných vláken.*



Obrázek 11: Modifikace aparatury pro elektrostatické zvlákňování s rotujícím kolektorem pro výrobu orientovaných vláken.

### **Parametry výroby**

Byly vyrobeny scaffoldy v délce do 10 cm o vnitřním průměru 6 mm a tloušťkou stěny od 150 do 300  $\mu\text{m}$ . Pro výrobu vzorků s neuspořádanými vlákny byly použity otáčky 250, 500, 750, 1000 a 1250 RPM, pro dosažení orientovaných vláken byly použity otáčky 5000, 10000 a 12000 RPM. Zvlákňování probíhalo při napětí 7 až 8 kV ve vzdálenosti od kolektoru 20 cm. Byl použit roztok PCL o koncentraci 18% a zvlákňování trvalo 90 minut při rychlosti přísunu polymeru 3 až 5 ml/h. Použitá jehla měla průměr 0,6 mm. Celý proces probíhal při teplotě  $24,5 \pm 1^\circ\text{C}$  a relativní vlhkosti vzduchu  $35,5 \pm 1\%$ .

## ***Analýza struktury***

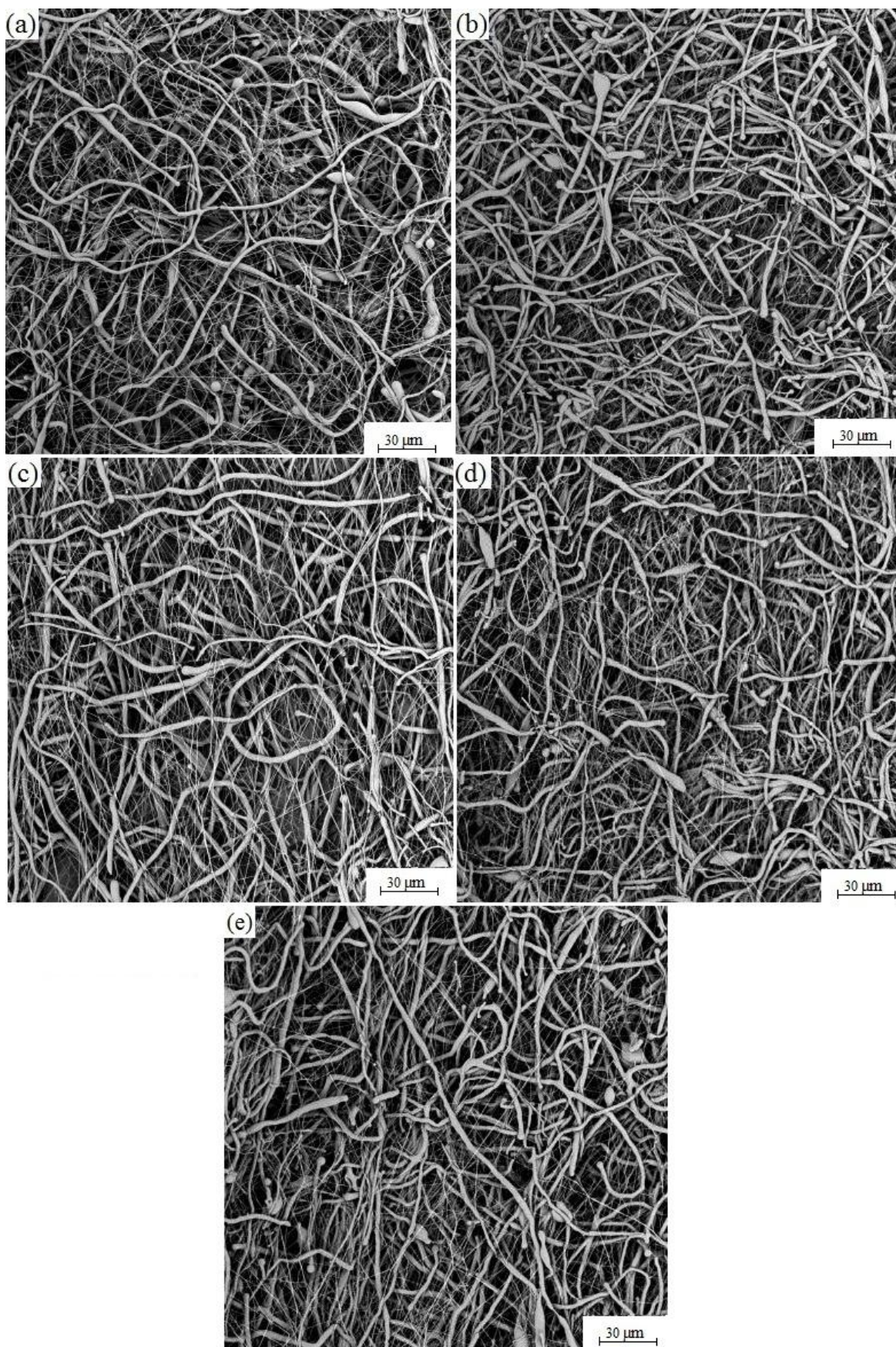
Vzorky byly nejprve potaženy na zlatičce (Quantum, Q150R-ES) vrstvou zlata tlustou 7 nm. Poté byla struktura vláken analyzována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Phenom, FEY). Pro analýzu orientace vláken bylo měřeno (u každého vzorku) minimálně 100 náhodně vybraných vláken ze snímku programem NIS-elements AR Analysis. Mechanické testy byly provedeny na trhacím stroji (LabTest 2.05)

### **3.1.2. Výsledky**

#### ***Zvláknění na kolektor s nízkými otáčkami***

Bylo vyrobeno 5 různých vzorků cév při otáčkách 250, 500, 750, 1000 a 1250 RPM. Ze snímků z elektronového mikroskopu (*Obrázek 12*) je zřejmé, že vlákna jsou orientovaná zcela náhodně. Všechny vzorky obsahují 2 druhy vláken, která se výrazně liší průměrem. Z experimentální zkušenosti víme, že to je způsobeno použitím roztoku chloroformu s ethanolem jako rozpouštědla.



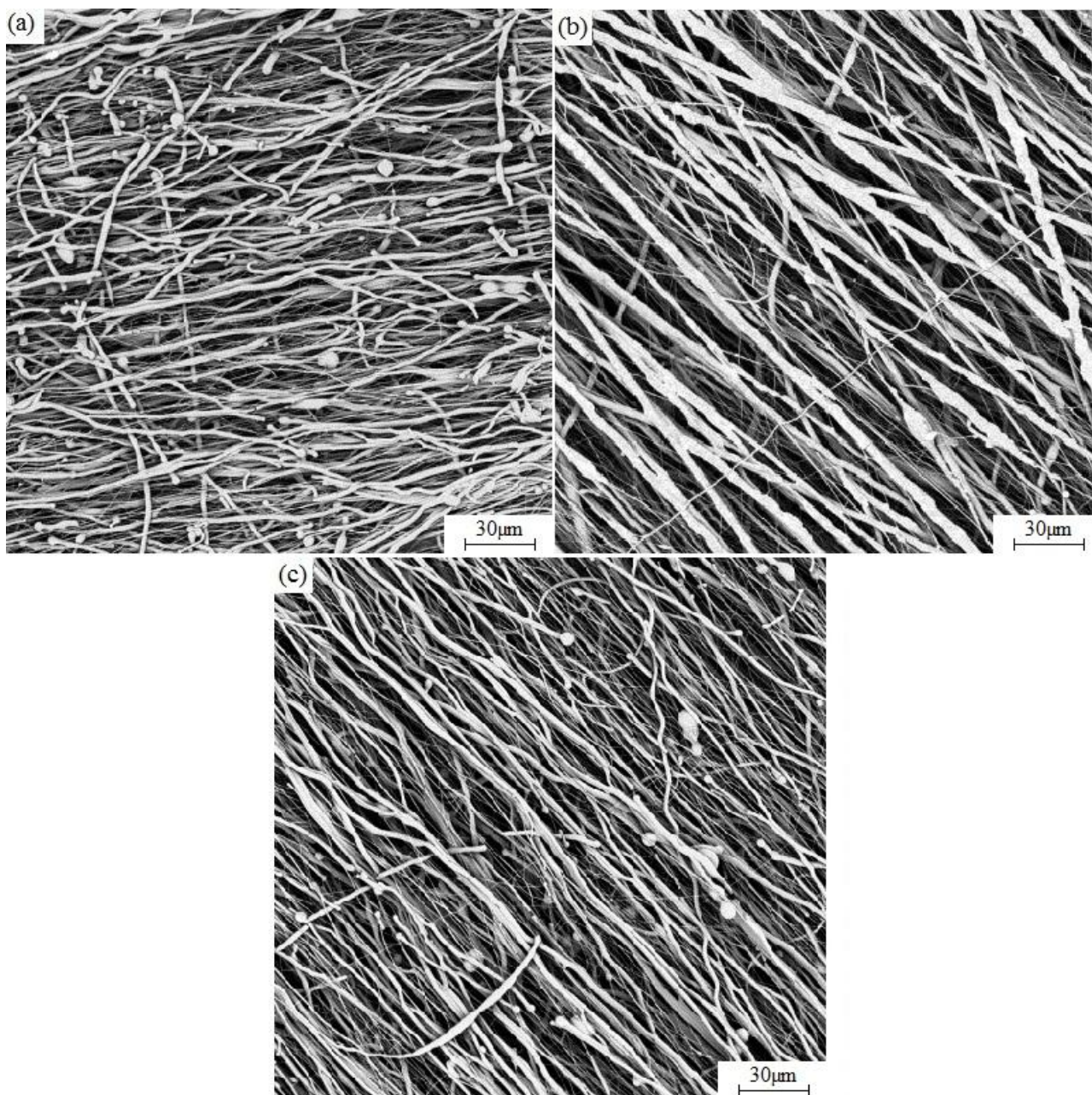


Obrázek 12: Vzorky připravené elektrospinningem z 18% roztoku PCL na rotační kolektor při otáčkách 250 (a), 500 (b), 750 (c), 1000 (d) a 1250 (e) RPM.



### *Zvlákňování na kolektor s vysokými otáčkami*

Byly připraveny 3 scaffoldy při otáčkách kolektoru 5000, 10000 a 12000 RPM (*Obrázek 13*). Otáčky byly dostatečné, pro dosažení orientované struktury vláken. Jako u vzorků připravených při nízkých otáčkách, i zde můžeme vidět vlákna 2 různých průměrů.



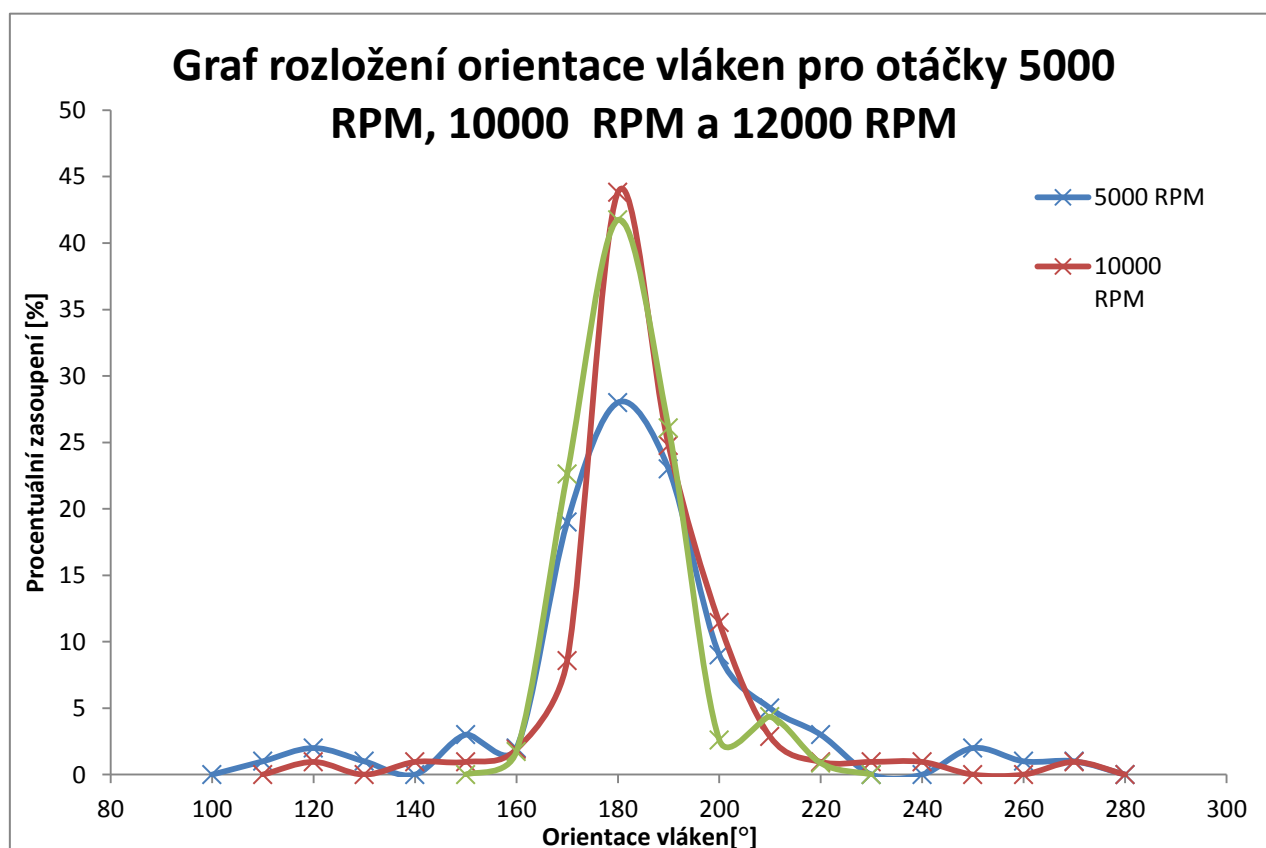
*Obrázek 13: Snímky zobrazující vzorky s orientovanými vlákny, kterých bylo dosaženo při otáčkách 5000 RPM (a), 1000 RPM (b) a 12000 RPM (c).*

## Analýza orientace vláken

Naměřené výsledky byly zpracovány do tabulky a do grafu. *Tabulka* Iukazuje, že nejvyššího stupně orientace je dosaženo při otáčkách 12000 RPM, zatímco nejmenší stupeň orientace vykazoval vzorek vyrobený při otáčkách 5000 RPM. Celkové rozložení vláken znázorňuje *Graf 1*.

*Tabulka 1: Orientace vláken při různých otáčkách kolektoru*

RPM	Průměr	Směrodatná odchylka procentuálního zastoupení	Nejmenší úhel	Největší úhel
5000	179,8	24,3	107,2	267,3
10000	180,7	17,3	118,6	269,0
12000	177,2	10,6	151,8	218,5



*Graf 1: Procentuální rozložení orientace vláken u vzorků připravených na rotačním kolektoru při otáčkách 5000 RPM, 10000 RPM a 12000 RPM.*

## ***Analýza mechanických vlastností scaffoldů***

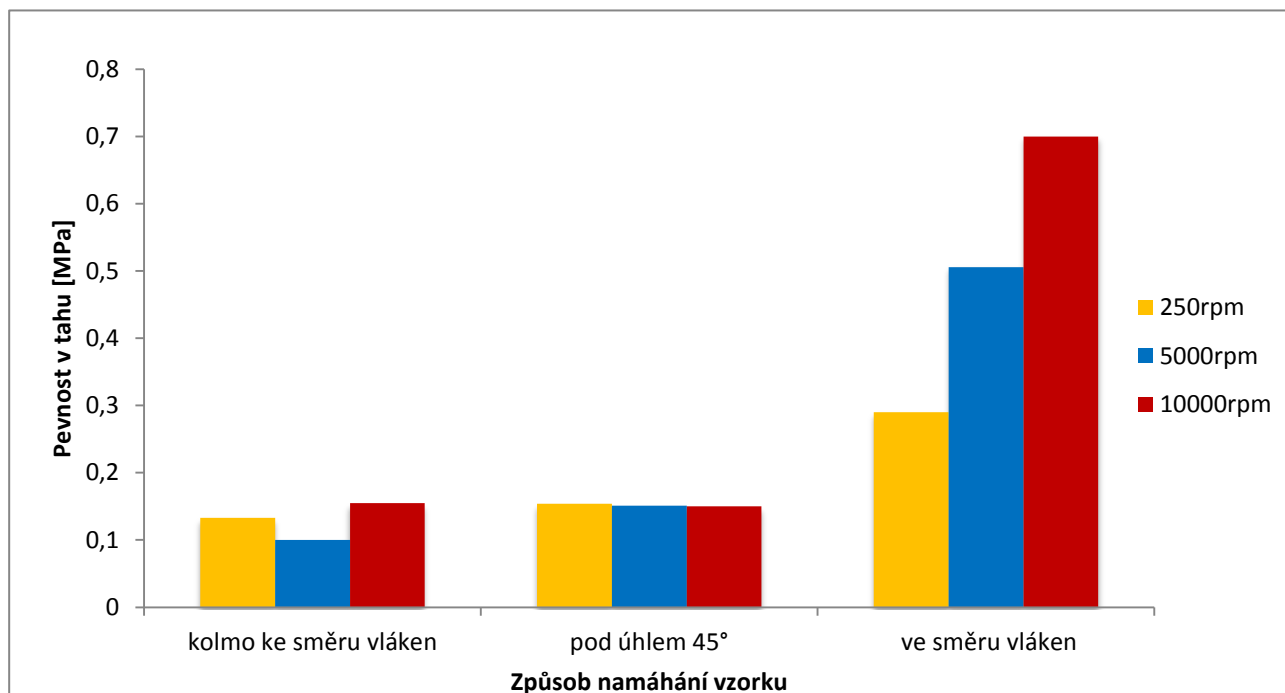
Mechanické vlastnosti nanovláknenných tkáňových nosičů byly hodnoceny u vzorků s náhodnou orientací vláken (250 RPM) a u vzorků s orientovanými vlákny vyrobenými při otáčkách 5000 RPM a 10000 RPM. Každé měření bylo provedeno dvakrát. Pro testování byly připraveny vzorky o rozměrech 10×16 mm. U všech vzorků byla změřena jejich tloušťka.

*Tabulka 2* a *Graf 2* ukazují, že největší pevnosti v tahu ve směru vláken dosáhl vzorek připravený při otáčkách 10000 RPM, tedy vzorek s nejvyšší orientací vláken. Pevnosti v tahu měřené pod úhlem 45° vychází u všech vzorků téměř shodně. Celkově nejnižší pevnost v tahu vyšla u měření vzorků kolmo ke směru vláken. Na druhé straně, mechanické vlastnosti vzorku připraveného při nízkých otáčkách kolektoru se v závislosti na směru se mění relativně méně.

*Tabulka 2: Vyhodnocení pevnosti v tahu pro vzorky připravené s použitím různých otáček kolektoru. Namáhání vzorků bylo provedeno ve směru vláken, pod úhlem 45° a kolmo ke směru vláken.*

Pevnost v tahu [MPa]			
Otáčky kolektoru	kolmo ke směru vláken	pod úhlem 45°	ve směru vláken
250	0,133	0,154	0,29
5000	0,1	0,151	0,506
10000	0,155	0,15	0,7



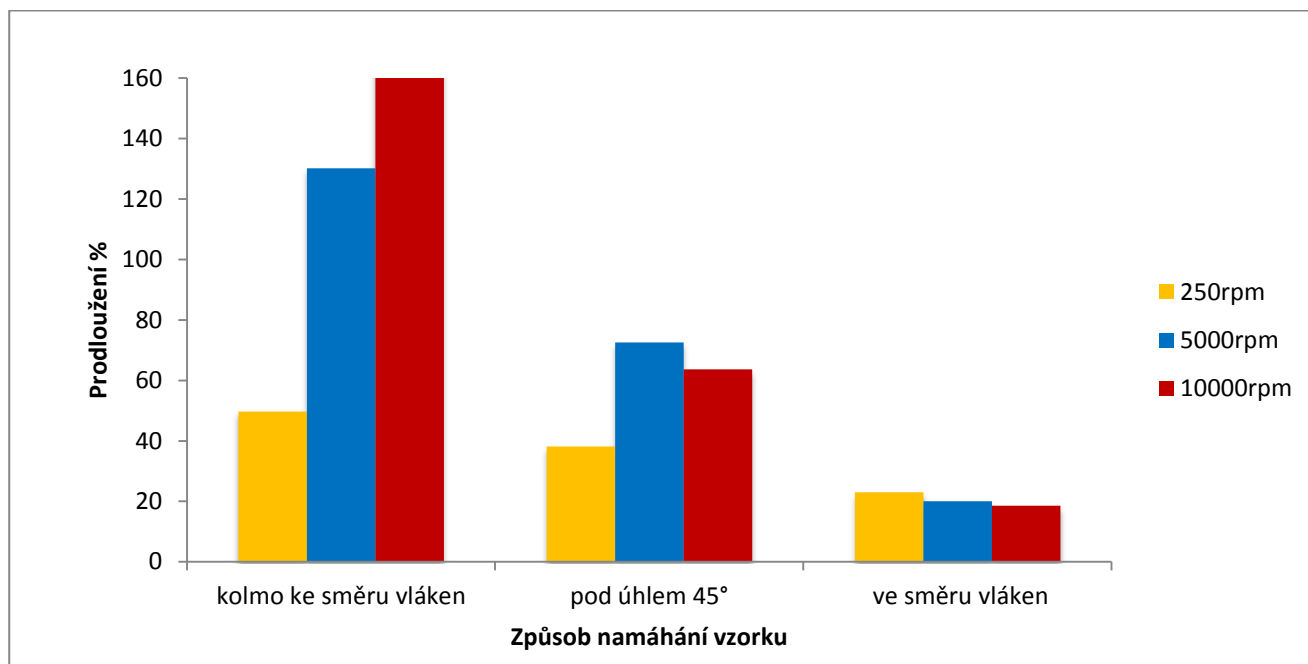


*Graf 2: Výhodnocení pevnosti v tahu pro vzorky připravené s použitím různých otáček kolektoru. Namáhání vzorků bylo provedeno ve směru vláken, pod úhlem 45° a kolmo ke směru vláken.*

Hodnoty procentuálního prodloužení ukazují *Tabulka 3* a *Graf 3*. Z grafu můžeme vidět, že nejvyššího prodloužení bylo dosaženo u vzorku, který byl připraven při otáčkách 10000 RPM při namáhání kolmo ke směru vláken, při namáhání po směru vláken bylo však jeho prodloužení výrazně nižší. Mechanické vlastnosti vzorku připraveného při nízkých otáčkách kolektoru se v závislosti na směru se mění výrazně méně než u vzorků připravených při vysokých otáčkách.

*Tabulka 3: Relativní prodloužení vzorků (připravených při otáčkách 250 RPM, 5000 RPM a 10000 RPM) způsobené mechanickým namáháním ve směru vláken, pod úhlem 45° a kolmo ke směru vláken.*

Relativní prodloužení [%]			
Otáčky kolektoru	kolmo ke směru vláken	pod úhlem 45°	ve směru vláken
250	49,74	38,2	22,98
5000	130,23	72,6	20,05
10000	165,61	63,68	18,52



*Graf 3: Relativní prodloužení vzorků (připravených při otáčkách 250 RPM, 5000 RPM a 10000 RPM) způsobené mechanickým namáháním ve směru vláken, pod úhlem 45° a kolmo ke směru vláken.*

### 3.2. Analýza vzorků střídavého elektrostatického zvlákňování

Bylo připraveno několik vzorků nanovláken polyvinylbutyralu (PVB) metodou střídavého elektrostatického zvlákňování a dále vzorky připravené stejnosměrným elektrostatickým zvlákňováním, aby bylo možné provést jejich srovnání. Dále byly střídavým elektrostatickým zvlákňováním připraveny 2 vzorky navíjené na rotační válcový kolektor při různých vzdálenostech od elektrody. Všechny vzorky byly zkoumány elektronovým mikroskopem a byla charakterizována jejich vnitřní struktura.

### 3.2.1. Střídavé zvlákňování

Střídavé elektrostatické zvlákňování je zcela nová technologie výroby nanovláken. Princip této metody připomíná stejnosměrné elektrostatické zvlákňování, je však použito střídavé napětí. Díky tomu vznikají vlákna s kladným i záporným nábojem. Jejich vzájemnou interakcí vzniká neutrální svazek, jak ukazuje *Obrázek 14*. To s sebou přináší mnoho zajímavých změn a úkazů,



*Obrázek 14: Ukázka výroby vláken metodou AC elektrospinningu. Z elektrody vychází sloup neutrálních vláken.*

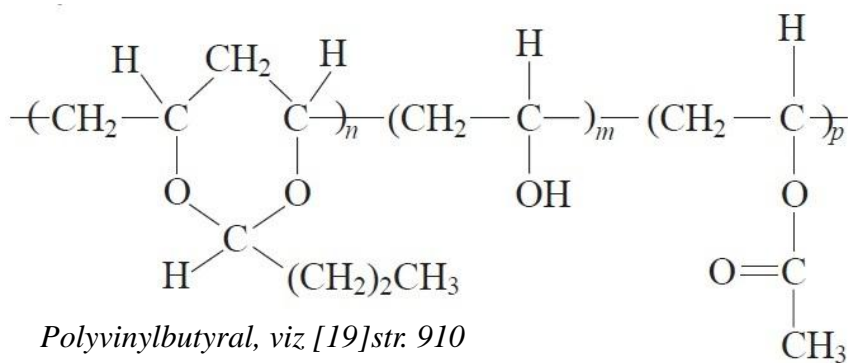
které u stejnosměrného elektrostatického zvlákňování nenajdeme. Proto je nutné provést základní analýzu vzorků připravených touto metodou a také porovnat jejich strukturu se vzorky vzniklými při stejnosměrném zvlákňování. Jedná se o technologii, která má jistě značný potenciál. Jednou z možností využití by mohla být výroba tkáňových nosičů pro cévní implantáty.

Pro rozlišení střídavého a stejnosměrného elektrospinningu budu dále používat zkratky DC pro stejnosměrný (z anglického direct current) a AC pro střídavý (z anglického alternating current).

### 3.2.2. Metody

#### *Použité materiály a příprava roztoků*

18% roztok polyvinylbutyralu (Mw 60000, Kuraray) s ethanolem (Sigma – Aldrich) byl míchán přes noc při teplotě 50 °C, aby vznikla homogenní směs. Pro přípravu vzorků se používaly i starší roztoky, jelikož se jedná o začátky výzkumu.



#### *Zvlákňovací aparatura pro DC elektrospinning*

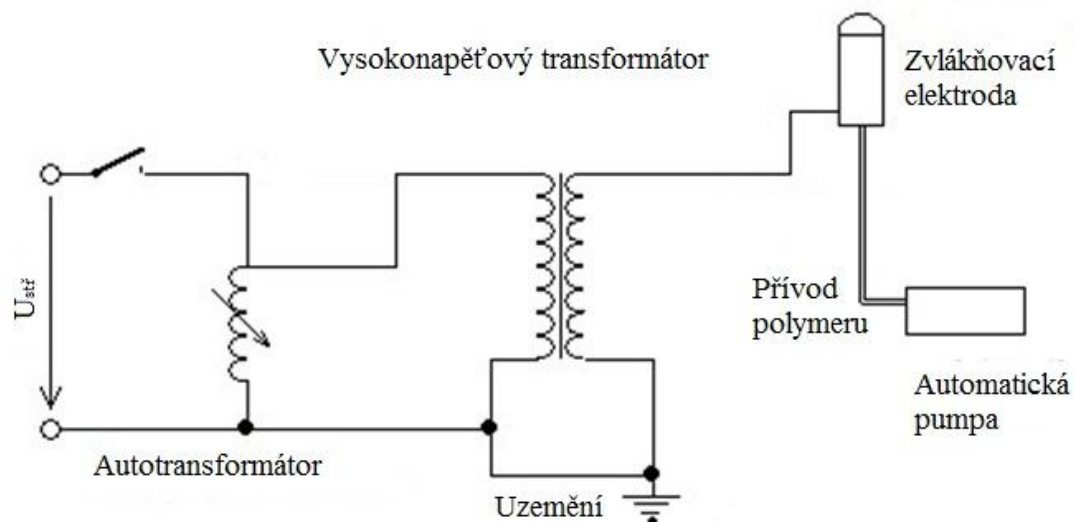
Aparatura pro DC elektrospinning se skládala z tyčky o průměru 1 cm a délce 15 cm. Jako kolektor byla použita kovová deska čtvercového tvaru o délce stěny 30 cm. Elektroda byla umístěna ve vzdálenosti 15 cm od kolektoru. Napětí poskytoval zdroj vysokého napětí (Matsusada Precision Inc., Japan).

#### *Zvlákňovací aparatur a pro AC elektrospinning*

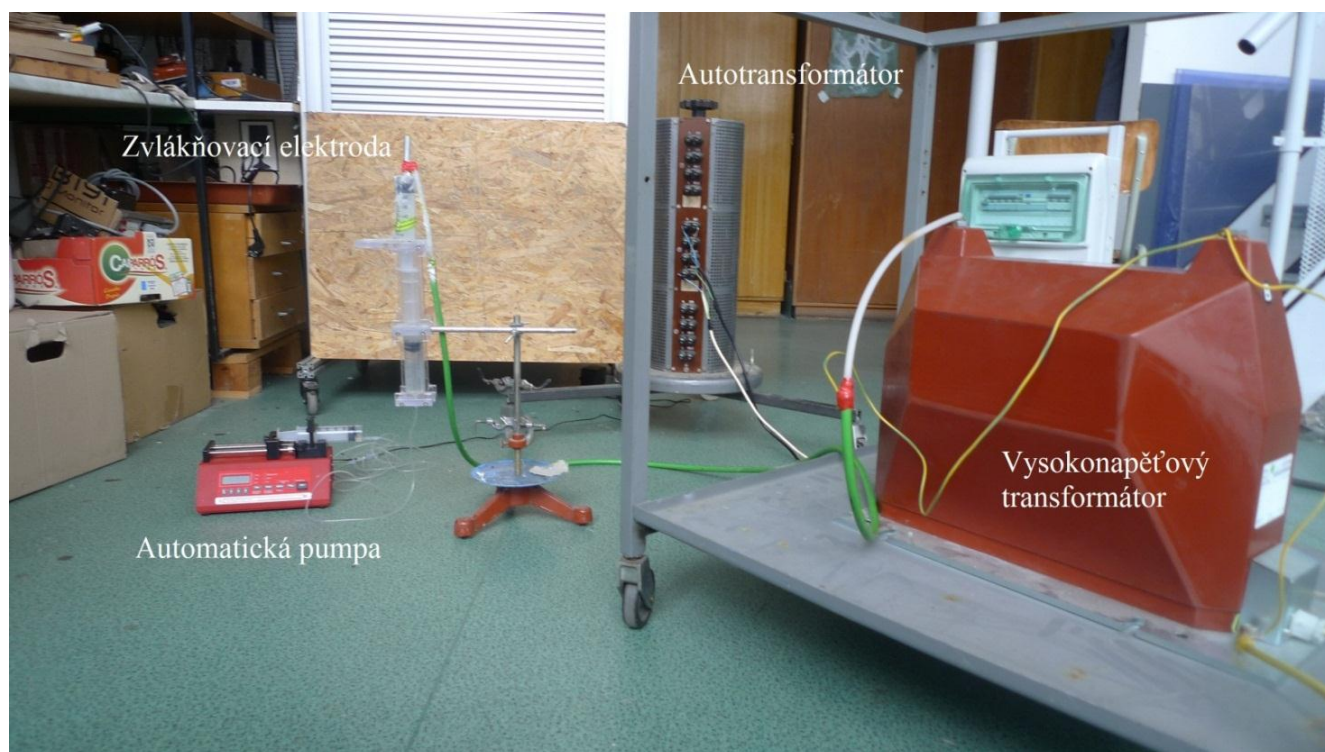
Obrázek 15 ukazuje schéma aparatury pro střídavé elektrostatické zvlákňování, Obrázek 16 její reálné uspořádání. Autotransformátor (Křižík Praha Smíchov, RAT 3×10, 8980) je zapojen do elektrické sítě. Slouží k regulaci napětí vstupujícího do vysokonapětového transformátoru (ABB, KGUG 36, 1VLT5212006685). Transformátor transformuje napětí v poměru 1:156. Maximální výstupní napětí je tedy  $U_{\text{eff}} = 36 \text{ kV}$ . Z vysokonapětového transformátoru je vyvedena elektroda (Obrázek 17b). K té je silikonovou hadičkou přiváděn polymer a jeho přísun zajišťuje automatická pumpa (Model NE-1000x; New Era Pump Systems Inc.). Aparatura byla postavena v souladu

s patentovou přihláškou [PS3862CZ].

Pro sběr vláken (*Obrázek 17a*) byl použit (jako rotační kolektor) válec o průměru 8 cm a délce 45 cm s volitelnými otáčkami v rozsahu od 3 RPM do 150 RPM poháněný elektromotorem.

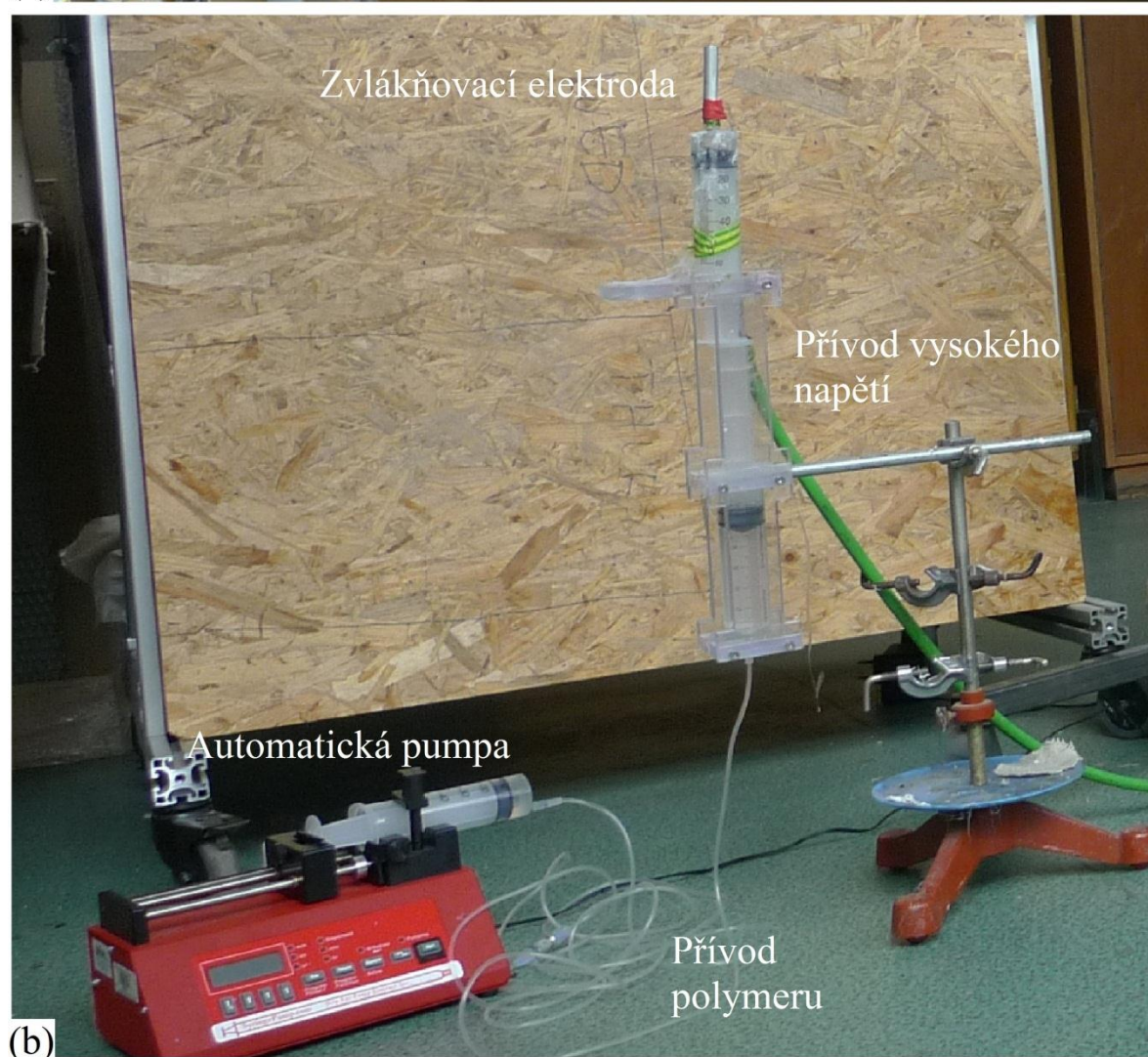
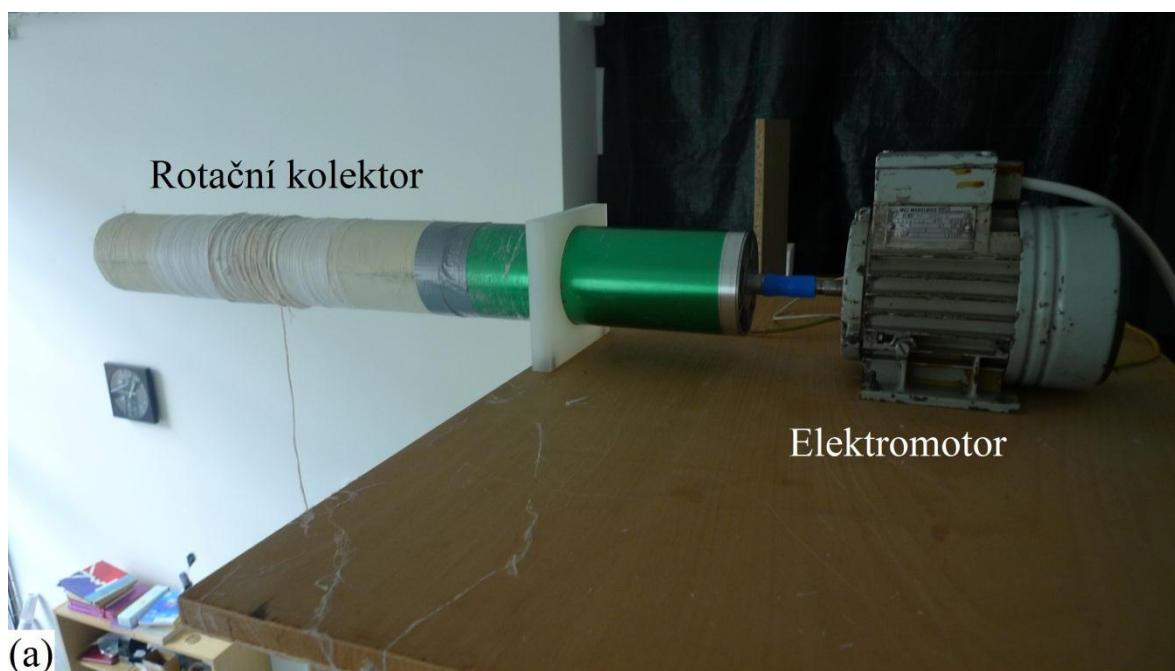


*Obrázek 15: Schéma aparatury pro AC elektrospinning*



*Obrázek 16: Ukázka aparatury používané pro AC elektrospinning. Autotransformátor slouží k regulaci napětí ze sítě do vysokonapětového transformátoru. Z vysokonapětového transformátoru je napětí přivedeno na elektrodu.*





Obrázek 17: (a) Rotační kolektor používaný k navíjení svazku vláken. (b) Zvlákňovací elektroda s přívodem polymeru a připojením k vysokému napětí

### ***Parametry stejnosměrného zvlákňování***

Vlákna byla odebírána na papírovou podložku připevněnou ke kolektoru při použitém napětí 17,2 kV. Zvlákňování probíhalo při teplotě 21,7 °C a relativní vlhkosti vzduchu 39,7 %.

### ***Parametry střídavého zvlákňování***

Zvlákňování bez kolektoru probíhalo při efektivním napětí 22,9 kV, 28,6 kV a 32,7 kV a frekvenci 50 kHz z elektrody o průměru 1 cm. Proces zvlákňování byl velmi živý a plynulý. Ve všech případech se vytvořil se sloup vláken, která bylo možno odebírat pomocí kartonových proužků. Zvlákňování probíhalo při teplotě 25,8 °C a relativní vlhkosti vzduchu 41,8 %.

Pro přípravu vzorků navíjených na válcový kolektor bylo použito efektivní napětí 21,3 kV, frekvence 50 kHz a průměr elektrody byl 1 cm. Byly připraveny 2 vzorky a to při vzdálenostech kolektoru 1 m a 4 m. Obvodová rychlost válce byla 0,02 m/s. Rychlost navíjení byla zvolena tak, aby nedošlo k přetržení svazku vláken. Proces se podařilo ustálit a vytvořit na kolektoru nerovnoměrnou vrstvu vláken. Zvlákňování probíhalo při teplotě 25,3°C a relativní vlhkosti vzduchu 42,4%.

### ***Charakterizace struktury***

Vzorky byly nejprve pozlaceny zlatičkou (Quantum, Q150R-ES). Pro charakterizaci struktury všech vzorků byly použity skenovací elektronové mikroskopy (Phenom, FEY a ULTRA Plus, Carl Zeiss). Ze snímků byly poté změřeny průměry vláken programem NIS-elements AR Analysis. Byly spočítány průměrné tloušťky vláken a rozložení průměrů vláken bylo vyneseno do grafu.

#### **3.2.3. Výsledky**

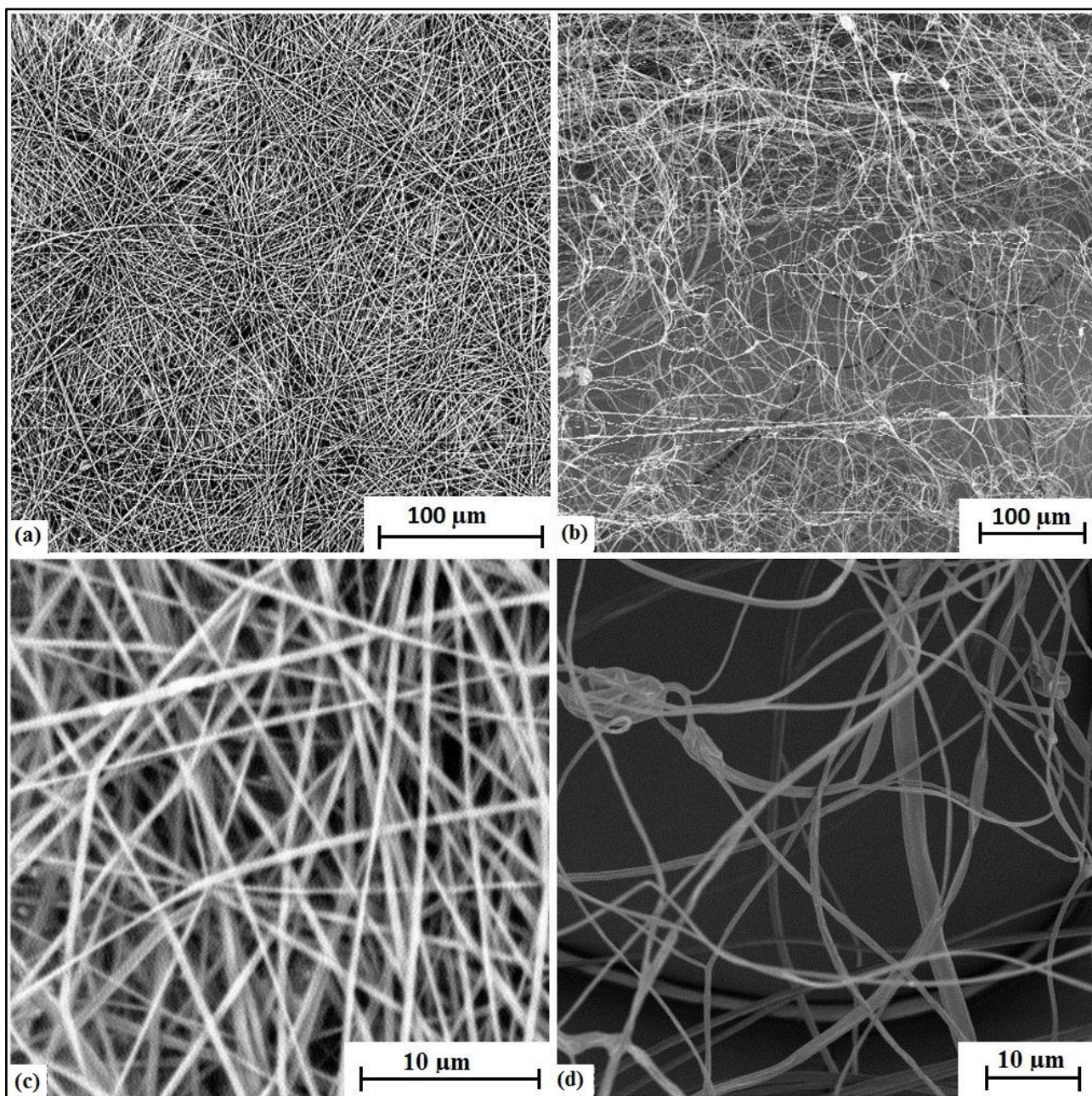
Vzorky byly analyzovány. Výsledkem je kvalitativní a kvantitativní popis jejich struktury a jejich srovnání se vzorky DC elektrospinningu. Ukazuje se, že struktura vláken připravených těmito metodami se velmi liší. Postupně se zaměřím na jednotlivé charakteristiky.

### ***Střední integrální křivost vláken***

Vlákna vzniklá AC elektrospinningem mají na první pohled jiný charakter než ty z DC elektrospinningu. Netvoří jen tenkou 2D vrstvu. Jejich struktura je načechná.

To je způsobeno výrazně vyšší křivostí vláken, kterou můžeme pozorovat na obrázku č. 18. Je vidět, že střední integrální křivost vláken na obrázcích a) a c) je téměř nulová, na rozdíl od vláken na obrázcích b) a d). Lze předpokládat, že to působí jednak nepřítomnost kolektoru, a také to, že se spolu setkávají vlákna s různým nábojem, která se mohou vzájemně přitahovat i odpuzovat.



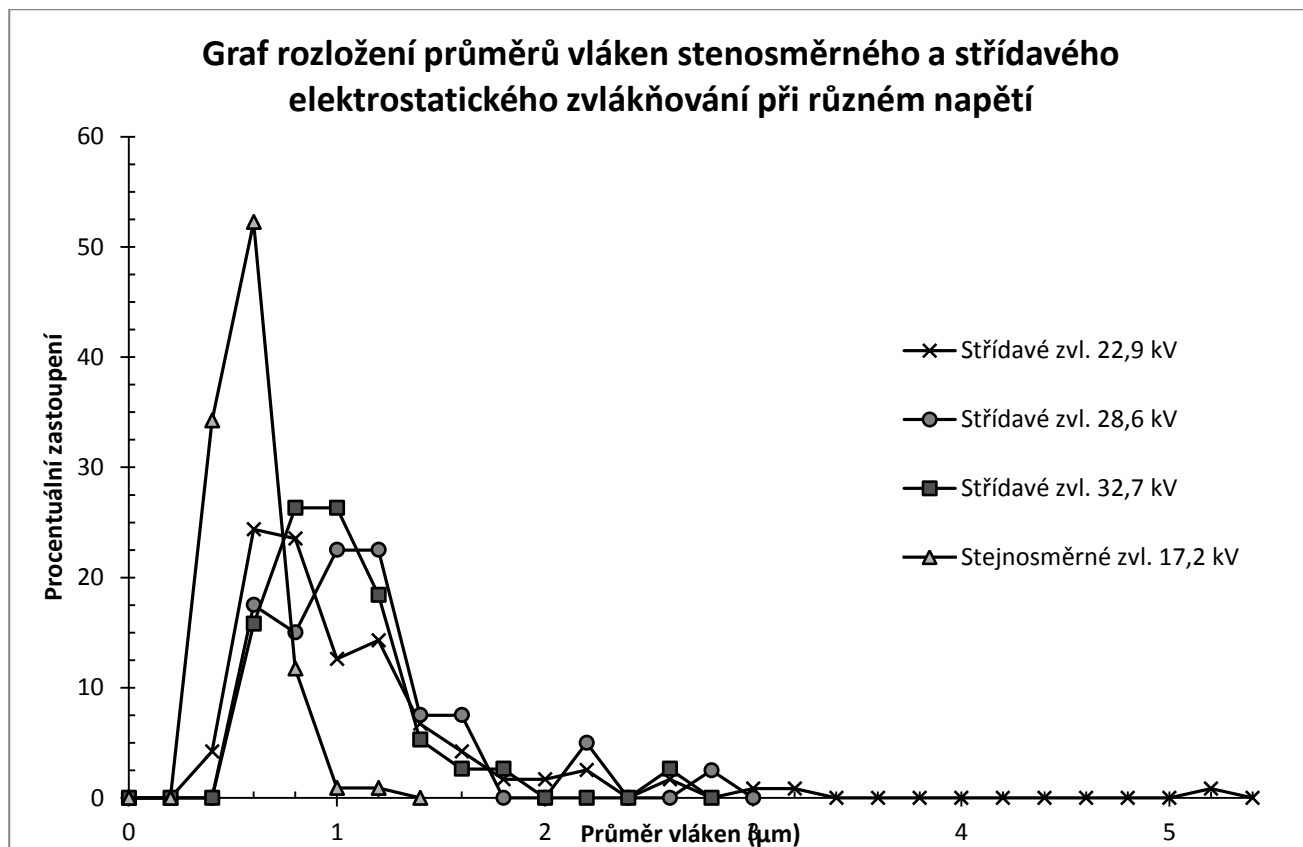


Obrázek 18: Obrázky (a) a (c) (Phenom, FEY) ukazují vlákna připravená DC elektrospinningem, obrázky (b) a (d) (Ultra plus, Carl Zeiss) vlákna připravená AC elektrospinningem.

Analýza průměrů vláken ukazuje značné rozdíly mezi DC a AC elektrospinningem. Průměrná tloušťka vláken z DC elektrospinningu byla 472 nm, u AC v rozmezí 936 – 1028 nm. Na grafu 2 můžeme vidět, že také rozložení průměrů vláken je u obou metod odlišné. Většina vláken vyrobená DC elektrospinningem spadá svými průměry do relativně malého intervalu. U AC zvláknování se objevuje mnohem více vláken výrazně tlustších, než je průměrná hodnota. Vliv velikosti efektivního napětí na tloušťku vláken nebyl zaznamenán (viz tabulka č. 1).

Tabulka 4: Průměrná tloušťka vláken získaná metodou DC a AC elektrospinningu při různém napětí

metoda	DC elektrospining	AC elektrospining		
napětí [kV]	17,2	22,9	28,6	32,7
průměr [nm]	472,3	961,5	1028,5	936,0



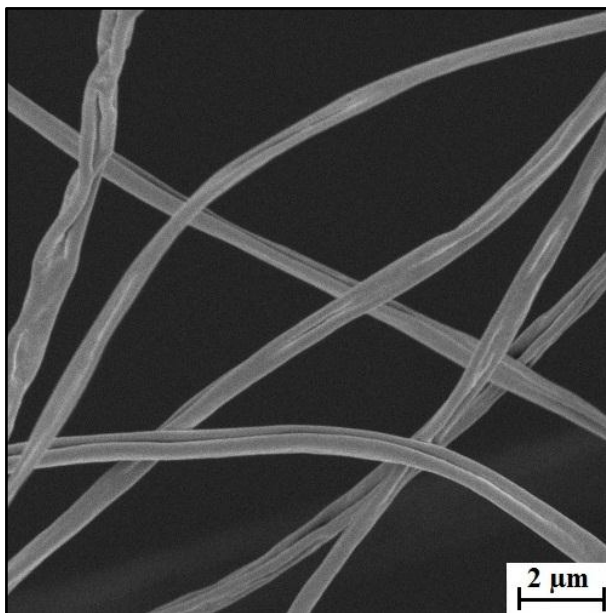
Graf 4: Rozložení průměrů vláken AC a DC elektrospinningu. Průměrná tloušťka vláken připravených metodou AC zvlákňování je větší než u metody DC zvlákňování. Ve vzorku připraveném AC elektrospinningem se také vyskytují vlákna výrazně tlustší, než je průměrná hodnota vzorku.

### Dvojce vláken

Charakteristickým znakem střídavého zvlákňování, jak můžeme vidět na Obr. 19, jsou dvojce vláken těsně přimknutých k sobě. Ve vzorku se dají nalézt i shluky více vláken. Lze předpokládat, že takovéto páry vznikají interakcí dvou různě nabitých vláken, která se k sobě přitáhnou, a tak vznikne elektricky neutrální pár. Podle dostupných snímků z elektronového mikroskopu se zdá, že dvojce a shluky značně převládají nad samostatnými vlákny. Bohužel, ze snímků nelze vždy určit s jistotou, zda je vlákno jedno nebo dvě, pokud je vlákno vystavené z boku.

Celkově odhaduji, že dvojce a shluky tvoří více než 85% vláken.

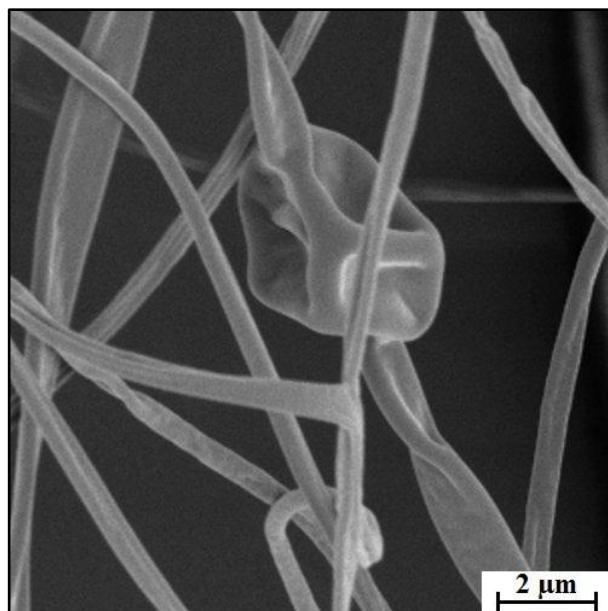
Je nutno poznamenat, že podobný úkaz je možné vidět i u stejnosměrného elektrospinningu z roztoků s vysokou koncentrací, ovšem s odlišným mechanismem procesu.



*Obrázek 19: Ukázka dvojic vláken připravených AC elektrospinningem (Ultra plus, Carl Zeiss).*

### **Vady**

Zatím všechny vzorky, které jsme metodou AC electrospinningu vyrobili, obsahovaly jistou obdobu korálek (Obr. 20). Jejich průměr se pohyboval od 4  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$  a délka až k 20  $\mu\text{m}$ . Tvarem se liší od korálek vznikajících u stejnosměrného elektrospinningu. Nejsou zcela kulaté a navíc jsou vždy součástí dvojce vláken. Povrch těchto korálek je členitý a připomíná křížalu.



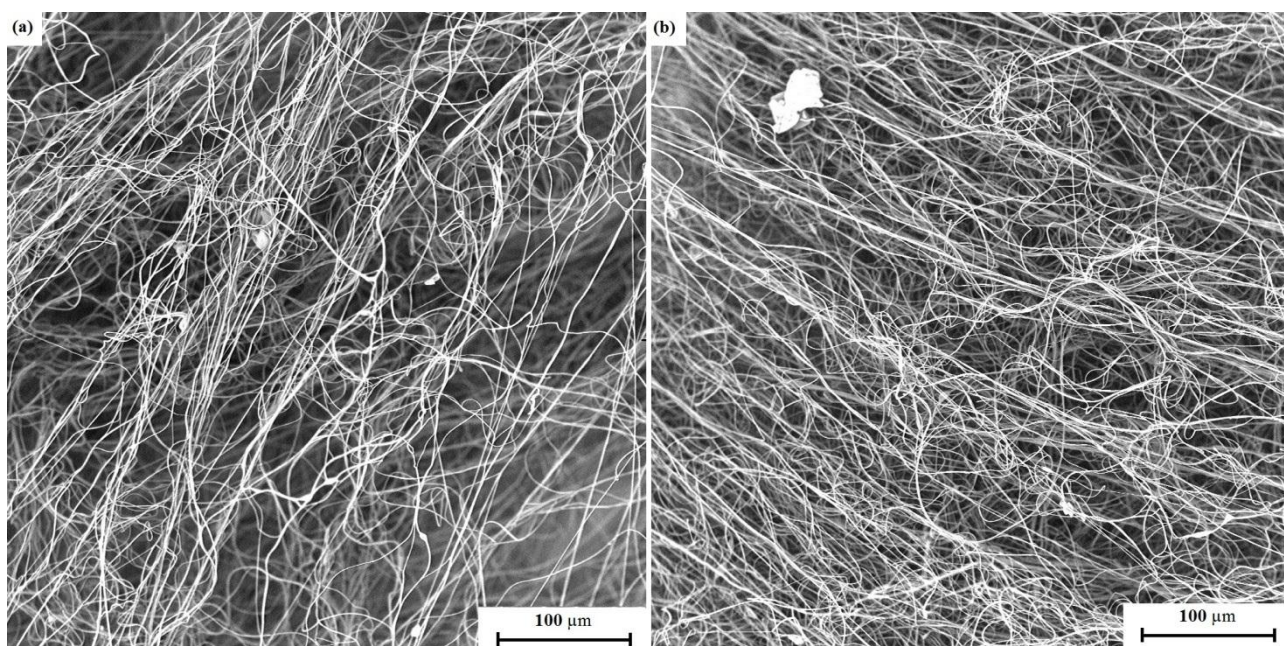
### ***Střídavé elektrostatické zvlákňování s rotačním válcovým kolektorem***

Zdá se, že pomocí rotačního kolektoru na AC zvlákňování můžeme dosáhnout částečného uspořádání vláken (Obr. 21). Otázka je, zda je tímto způsobem možné dosáhnout vyšší úrovně uspořádání, protože při vyšších rychlostech otáčení se svazek vláken začíná trhat. V každém případě je využití rotačního kolektoru vhodným řešením sběru vláken. Navíc pro výrobu tkáňových nosičů pro výrobu cévních implantátů je navíjení vláken zcela nezbytné.

### ***Vliv vzdálenosti kolektoru na strukturu vláken***

Z měření průměrů vláken je zřejmé, že vzdálenost rotačního kolektoru od elektrody při AC elektrospinningu nemá žádný vliv na výsledné průměry vláken. Nedochází ani ke vzniku větších shluků vláken (viz graf 2 a Tab. 3) a rozložení jejich průměrů je podobné. Zatím však nelze rozhodnout, zda má tato vzdálenost vliv na makroskopické uspořádání vláken.

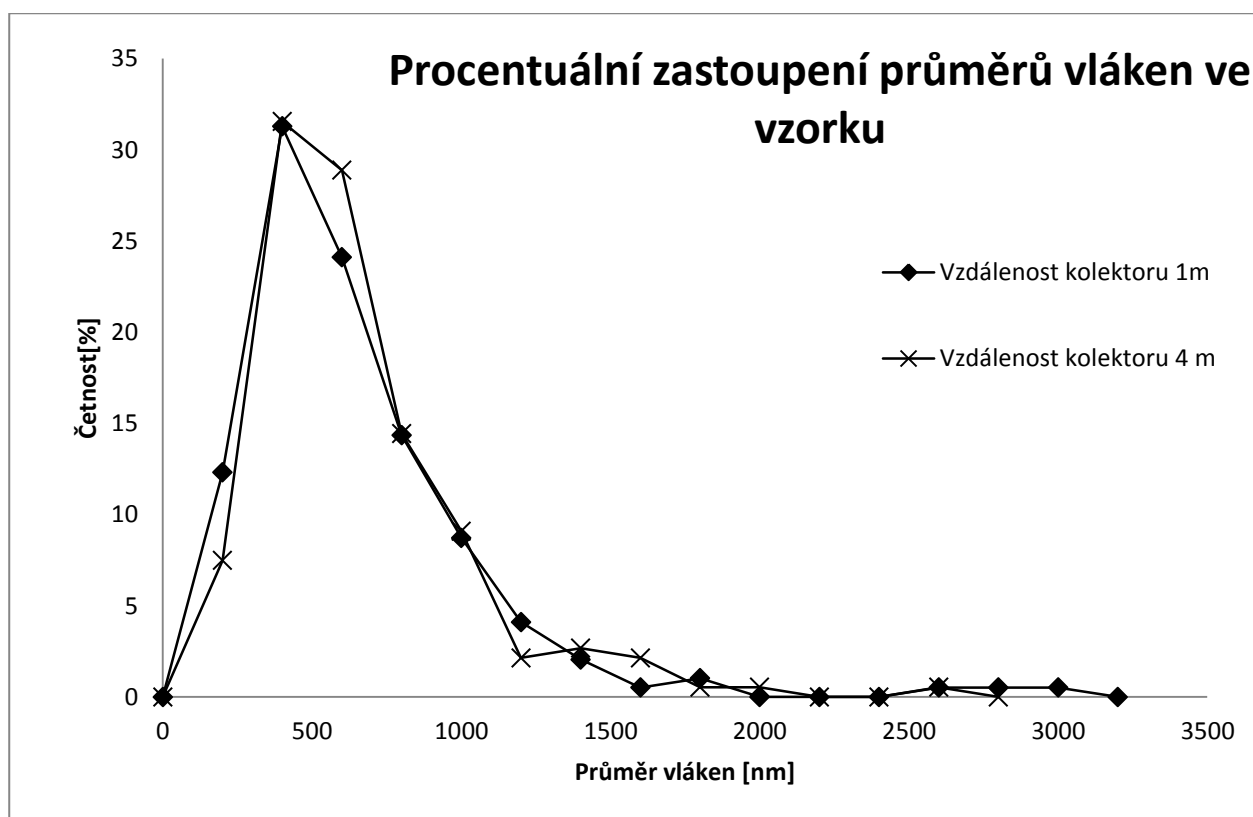




Obrázek 21: Vzorky připravené metodou AC elektrospinningu na rotující válcový kolektor ve vzdálenosti (a) 1 metr a (b) 4 metry (Phenom, FEY).

Tabulka 5: Vliv vzdálenosti rotujícího válcového kolektoru na průměr vláken.

vzdálenost kolektoru [m]	1	4
Průměrná tloušťka vláken [nm]	744,1333	759,1337



*Graf 5 : Porovnání průměrů vláken při různých vzdálenostech válcového kolektoru od zvláknovací elektrody.*

## Závěr

V rámci této bakalářské práce byla vyrobena aparatura pro výrobu tkáňových nosičů pro cévní implantáty. DC elektrospinningem byly vyrobeny tkáňové nosiče z PCL s neuspořádanou a s uspořádanou strukturou. Analýza struktury ukázala, že nejvíce uspořádanou strukturu vykazoval vzorek připravený při otáčkách kolektoru 12000 RPM. Analýza struktury vláken také ukázala, že všechny vzorky připravené DC elektrospinningem obsahovaly vlákna 2 průměrů, což by mohlo mít pozitivní vliv na pěstované buňky. Vrstvy orientovaných vláken PCL by se dalo využít pro vytvoření vnitřní vrstvy cévní náhrady.

Do budoucna by bylo ještě vhodné zajistit posun elektrody, aby byly tloušťky vyrobených vzorků rovnoměrné. Také je třeba zlepšit technologii sundávání tkáňových nosičů z kolektoru, jelikož při něm často dochází k poškození vzorků. Poslední věc, na kterou bychom se v budoucnu měli zaměřit, je zvětšení velikostí pórů těchto vzorků.

Dále byla sestrojena aparatura pro střídavé elektrostatické zvlákňování a byly připraveny a analyzovány vzorky vyrobené touto metodou. Bylo zjištěno, že vzorky připravené touto metodou mají jinou strukturu, než vzorky připravené stejnosměrným zvlákňováním. Vykazují větší průměry vláken a jiné rozložení jejich průměrů. Pro jejich strukturu jsou také typické dvojice vláken a specifické korálky. Důležitou vlastností je vysoká střední integrální křivost vláken. Ta zajišťuje vyšší pórovitost vzorku. Lze předpokládat, že tato vlákna by se dala využít pro pěstování větších buněk, jako jsou hladké svalové buňky. Pro tento účel je však třeba použít jiný polymer než polyvinylbutyral, který nemá potřebné biologické vlastnosti.

Ideální by bylo požití biodegradabilního polymeru, jako je PCL. Předběžné pokusy o zvláknění toho polymeru AC elektrospinningem však nebyly příliš úspěšné. Je možné, že zvláknění PCL AC elektrospinningem by se mohlo podařit s použitím jiného rozpouštědla, než je chloroform:elthanol (9:1). Další práci je třeba věnovat vylepšení aparatury a dosažení plynulého procesu výroby, kterému zatím brání zasychání polymeru na elektrodě. Také je třeba zdokonalit proces zpracování vláken. Jako funkční se ukázalo navíjení na válcový kolektor. Druhou možností je mnou navržená metoda, chytání vláken na desku, čímž vzniká velmi načechná struktura. Náš tým také pracuje na zpracování těchto vláken jejich stáčením do příze.

## Seznam použitých pojmů

Aktin - Protein, který dokáže měnit energii ATP na energii mechanickou. Spolu s miosinem tvoří základ svalových vláken.

Apoptóza - Programovaná buněčná smrt.

Arteria linealis - Tepna, která přivádí krev do sleziny.

Ateroskleróza - Kornatění tepen, vzniklé ukládáním tukových látek do jejich stěn.

Cytokiny - Skupina buněčných signálních proteinů.

Diferenciace - Proces, kdy z nesespecializované buňky vzniká buňka více specializovaná a to jak strukturně tak funkčně.

Elektroblowing - Technika výroby nanovláken, která kombinuje princip elektrospinningu s prouděním vzduchu kolem elektrody.

Fibroblast - Buňka tvořící základ vazivové tkáně. Obvykle má hvězdovitý tvar a velikost od 10 – 15  $\mu\text{m}$  [29].

Fibronectin - Bílkovina obsažená v extracelulární hmotě, trombocytech aj. Podílí se na adhezi buněk patří k adhezivním glykoproteinům.

Fokální adheze - Struktura různých proteinů, které se podílejí jednak na přichycení buňky k substrátu a pak také na její komunikaci s okolním prostředím.

Forcespinning - Technologie výroby nanovláken, která pro jejich formování využívá odstředivou sílu.

Hladké svalové buňky - Buňky tvořící hladkou svalovinu, kterou nelze ovládat vůlí. Jsou součástí stěny cév, ale i jiných orgánů. Jejich délka může pohybovat mezi 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  [29].

Hyperplazie - Zvětšení orgánu způsobené množením buněk.

In vitro - Mimo živé tělo, neboli ve zkumavce.

In vivo - V živém těle.

Integrin - Protein sloužící jako buněčný receptor. Hraje roli při přichytávání buňky k substrátu, ale také například buňce zprostředkovávají informace o chemických a mechanických vlastnostech substrátu.

Ischemická choroba srdeční - Snížení krevního zásobení srdce.

Laminin - Jeden z proteinů extracelulární matrix, základní složka bazální membrány

Kolagen – Jedna ze základních složek mimobuněčné hmoty. Zajišťuje v tkáni mechanickou pevnost.

Meltblown - Metoda výroby mikrovláken, která se běžně používá pro výrobu netkaných textilií.

Polymerní tavenina je tlačena skrz trysky a tažena proudem vzduchu. Po ochlazení vznikají vlákna.

Meltspining - Zvlákňování z taveniny.



Miozin - Protein, který dokáže měnit energii ATP na energii mechanickou. Spolu s aktinem tvoří základ svalových vláken.

Proliferace - Buněčné množení.

Self-assembly - Proces, při kterém se vytvoří organizovaná struktura na základě specifických lokálních interakcí. Tímto procesem lze připravit, mimo jiné, i nanovlákná.

Splenektomie - Odoperování sleziny.

Spunbond - Metoda výroby mikrovláken, která se běžně používá pro výrobu netkaných textilií.

Polymerní tavenina je tlačena skrz trysky a tažena proudem vzduchu. Po ochlazení vznikají vlákna.

Tažení - Mechanické tažení polymerního roztoku takovou rychlostí, která zajistí přeměnu viskózního polymeru v pevné vlákno v důsledku vypařování rozpouštědla. Umožňuje uspořádat vlákna s vysokou přesností.

Template sythesis - Technika, využívaná pro přípravu nanomateriálů. Princip založený na odlívání vzorků podle šablony.

Vena safena magna - Povrchová žíla dolní končetiny. Vede po vnitřní straně dolní končetiny od kotníku k tříslku. Při jejím odběru je její funkce zastoupena jinými žilami.

Vena saphena parva - Povrchová žíla dolní končetiny vedoucí od kotníku přes zadní stranu lýtku. Při jejím odběru je její funkce zastoupena jinými žilami.

## Seznam použité literatury

- [1] DODGE, J. T., B. G. BROWN, E. L. BOLSON a H. T. DODGE. Lumen diameter of normal human coronary arteries. Influence of age, sex, anatomic variation, and left ventricular hypertrophy or dilation. *Circulation*. 1992, **86**(1), 232-246. DOI: 10.1161/01.CIR.86.1.232. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.86.1.232>
- [2] Nemoci srdce. STOHWASSER, P. *Nabla* [online]. 2010-2013 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://www.nabla.cz/obsah/biologie/kapitoly/biologie-cloveka/nemoci-srdce.php>
- [3] SLOŽENÍ KRVE. *Krajská nemocnice T. Bati, a.s.* [online]. 2012 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://www.kntb.cz/slozeni-krve>
- [4] KRAJÍČEK, M., J. H. PEREGRIN, M. ROČEK a P. ŠEBESTA. *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-0607-8.
- [5] PALLUA, N. a Ch. V. SUSCHECK. *Tissue engineering: from lab to clinic*. Berlin: Springer, 2010. ISBN 978-364-2028-236.
- [6] ISENBERG, B. C., Ch. WILLIAMS, a R. T. TRANQUILLO. Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro. *Circulation Research*. 2005, **98**(1), 25-35. DOI: 10.1161/01.RES.0000196867.12470.84. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000196867.12470.84>
- [7] DHANDAYUTHAPANI, B., Y. YOSHIDA, T. MAEKAWA a D. S. KUMAR. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. 2011, **2011**, 1-19. DOI: 10.1155/2011/290602. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>
- [8] Nanotechnology definition (NSET, February 2000). *National science foundation* [online]. Arlington [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: [http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb\\_nifty50.jsp](http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp)
- [9] APLIKACE NANOTECHNOLOGIE. *Česká společnost pro nové materiály a*

*technologie* [online]. 2010 [cit. 2013-05-15]. Dostupné z: <http://csnmt.fme.vutbr.cz/OKO/2-6/pruv08.pdf>

[10] Key features of nanofibers. *Elmarco* [online]. 2004- 2012 [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: <http://www.elmarco.com/electrospinning/key-features-of-nanofibers/>

[11] Nanofibers. *Fiberio* [online]. 2011 [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: <http://fiberiotech.com/about/nanofibers/>

[12] About Nano Fibers. *SNS Nano Fiber Technology* [online]. 2013 [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: <http://www.snsnano.com/aboutNanoFibers.asp>

[13] About Nanofibers. *Nafigate* [online]. 2013 [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: <http://www.nafigate.com/en/section/portal/app/portal-article/detail/69818-about-nanofibers>

[14] ANDRADY, A. *Science and technology of polymer nanofibers*. Hoboken, J.Wiley, 2008, ISBN 04-717-9059-1.

[15] LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSEĎÁLKOVÁ, D. LUBASOVÁ, J. CHALOUPEK, P. POKORNÝ. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009, **41**(2), 59-140. ISSN 0040-5167. DOI: 10.1080/00405160902904641. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00405160902904641>

[16] EDWARDS, M. D., G. R. MITCHELL, S. D. MOHAN a R. H. OLLEY. Development of orientation during electrospinning of fibres of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *European Polymer Journal*. 2010, **46**(6), 1175-1183. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.03.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305710001291>

[17] HU, J., W. CHAO, P. LEE a Ch. HUANG. Construction and characterization of an

electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2012, **13** 140-155. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.04.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616112001348>

[18] XU, C, R INAI, M KOTAKI a S RAMAKRISHNA. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2004, **25**(5), 877-886. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00593-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203005933>

[19] MARK, J. E. (2009). Polymer Data Handbook (2nd Edition).. Oxford University Press. Online version available at: [http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=2620&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2620&VerticalID=0)

[20] SELL, S. A., M. J. MCCLURE, K. GARG, P. S. WOLFE a G. L. BOWLIN. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, **61**(12), 1007-1019. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09002257>

[21] LI, M., M. J. MONDRINOS, M. R. GANDHI, F. K. KO, A. S. WEISS a P. I. LELKES. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005, **26**(30), 5999-6008. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205002553>

[22] BOLAND, E. D., J.A. MATTHEWS a K.J. PAWLOWSKI. Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Frontiers in Bioscience*. 2004, **9**(1-3), 1009-10w19. DOI: 10.2741/1313. Dostupné z: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1313/list.htm>

[23] VAZ, C.M., S. VAN TUIJL, C.V.C. BOUTEN a F.P.T. BAAIJENS. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomaterialia*. 2005, **1**(5), 575-582. DOI: 10.1016/j.actbio.2005.06.006. Dostupné z:

[24] DONG, Y., T. YONG, S. LIAO, C. K CHAN a S RAMAKRISHNA. Long-term viability of coronary artery smooth muscle cells on poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) nanofibrous scaffold indicates its potential for blood vessel tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*. 2008-09-06, **5**(26), 1109-1118. DOI: 10.1098/rsif.2007.1354. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2007.1354>

[25] LEE, S. J., J. LIU, S. H. OH, S. SOKER, A. ATALA a J. J. YOO. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials*. 2008, **29**(19), 2891-2898. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002019>

[26] VENUGOPAL, J., Y. Z. ZHANG a S. RAMAKRISHNA. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology*. 2005, **16**(10), 2138-2142. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/028. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/16/i=10/a=028?key=crossref.3d57d6fce4e2f315aa56285fee1c620b>

[27] LEE, S. J., J. J. YOO, G. J. LIM, A. ATALA a J. STITZEL. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, **83**(4), 999-1008. DOI: 10.1002/jbm.a.31287. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31287>

[28] HUANG, Ch., X. GENG, K. QINFELI, M. XIUMEI, S. S. AL-DEYAB a M. EL-NEWEHY. Preparation of composite tubular grafts for vascular repair via electrospinning. *Progress in Natural Science: Materials International*. 2012, **22**(2), 108-114. DOI: 10.1016/j.pnsc.2012.03.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007112000287>

[29] Cytometrics. *Nanomedicine Book Site* [online]. 1996-2013 [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: <http://www.nanomedicine.com/NMI/8.5.1.htm>